



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VANESSA BEZERRA

**A FITORREMEDIAÇÃO ATENUA OS EFEITOS DO CÁDMIO
E DO NÍQUEL NO TELEÓSTEO NEOTROPICAL *Prochilodus
lineatus*?**

Londrina
2021

VANESSA BEZERRA

**A FITORREMEDIAÇÃO ATENUA OS EFEITOS DO CÁDMIO
E DO NÍQUEL NO TELEÓSTEO NEOTROPICAL *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 Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha

Londrina
2021

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

Bezerra, Vanessa.

A fitorremediação atenua os efeitos do cádmio e do níquel no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*? / Vanessa Bezerra. - Londrina, 2021.
99 f. : il.

Orientador: Juliana Delatim Simonato Rocha.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Bioacumulação de metais - Tese. 2. Biomarcadores - Tese. 3. Ecotoxicologia aquática - Tese. 4. Misturas metálicas - Tese. I. Delatim Simonato Rocha, Juliana. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

VANESSA BEZERRA

**A FITORREMEDIAÇÃO ATENUA OS EFEITOS DO CÁDMIO
E DO NÍQUEL NO TELEÓSTEO NEOTROPICAL *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: Dra. Juliana Delatim Simonato
Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Londrina, 21 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Juliana Delatim Simonato Rocha por todos os ensinamentos, preocupações, investimentos e incentivos que permitiram a realização desse trabalho. Por continuar acreditando em mim e me aceitar como aluna de pós-graduação. Muito obrigada, Ju!

Aos membros da banca avaliadora, por contribuírem com este trabalho e com meu crescimento acadêmico e profissional.

A todos os alunos (e alguns ex-alunos) do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA): Angélica, Caroline, Gabriella, Hellen, Jheimison, Jéssica, Júlia, Kathya, Laís, Luciana, Maria Eduarda, Mariana, Mayra, Milena Santos, Millena Cabral, Nicholas, Tiago e Willian. Todos sempre muito dispostos a ajudar, seja dentro ou fora do ambiente de trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao Wagner, técnico do LEFA, por toda paciência e ajuda nas amostragens e análises de metais.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Bueno dos Reis Martinez e ao Prof. Dr. Paulo César Meletti, que também coordenam o LEFA.

Às minhas amigas Paula, Mari e Duda, pela amizade e por todos os momentos de descontração e desabafo.

Ao Gabriel, por todo amor e companheirismo, pela ajuda na montagem de todos os experimentos, me levando na UEL aos finais de semana e feriados, e por todos os momentos em que o seu apoio foi essencial, muito obrigada!

À minha família, por contribuírem com todo o apoio necessário à minha formação e crescimento pessoal.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

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

“Na natureza não existem recompensas nem castigos. Existem consequências.”

Robert G. Ingersoll

BEZERRA, Vanessa. **A fitorremediação atenua os efeitos do cádmio e do níquel no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*?** 2021. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O cádmio (Cd) e o níquel (Ni) são metais que causam preocupação como contaminantes ambientais, pois ambos podem provocar diversos efeitos tóxicos em organismos aquáticos. A fitorremediação através da macrófita aquática *Lemna minor* se mostra como uma possível alternativa para o tratamento de ecossistemas aquáticos contaminados por metais. Desse modo, é de suma importância avaliar se esse tipo de tratamento atenua os efeitos subletais observados em organismos aquáticos devido à presença de metais como o Cd e o Ni. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar se os efeitos subletais observados em *Prochilodus lineatus* devido a sua exposição aos metais Cd e Ni, isolados ou em mistura, são atenuados na presença da macrófita aquática *L. minor*. Para isso, foram realizadas exposições de 96 h ao Cd na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, ao Ni na concentração de 1,5 mg L^{-1} , e a mistura destes dois metais, na presença ou ausência de *L. minor*. Ao final de todas as exposições, foram coletadas amostras de diferentes tecidos de *P. lineatus* para comparar a resposta de vários biomarcadores entre os animais expostos aos metais na presença ou ausência de *L. minor* sobre a superfície da água. Foram avaliados a bioacumulação de Cd e Ni, concentração de metalotioneínas, a frequência de micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares (AENs), a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), parâmetros hematológicos e plasmáticos, além da atividade de enzimas de transporte iônico e danos histológicos nas brânquias. A exposição ao Cd isolado na ausência de *L. minor* provocou bioacumulação em vários tecidos, alterações na atividade da AChE, redução na atividade de enzimas de transporte iônico na brânquia, além de desbalanços iônicos. A exposição ao Ni na ausência das macrófitas também provocou bioacumulação e desbalanços iônicos, bem como a indução de metalotioneínas, um aumento do índice de alterações histológicas na brânquia e um aumento da frequência de AENs. Os peixes expostos à mistura de metais na ausência de *L. minor* apresentaram todos os efeitos subletais observados nas exposições aos metais isolados, além de um aumento na glicemia. A fitorremediação evitou o acúmulo de metais em alguns tecidos de *P. lineatus*, a hiperglicemia, além de alterações na atividade da AChE e na frequência de AENs. Entretanto, danos histológicos nas brânquias, desbalanços iônicos e a bioacumulação, principalmente nas brânquias, não foram atenuados pela fitorremediação. Portanto, conclui-se que a fitorremediação de 96 h mediada pela macrófita aquática *L. minor* atenuou parcialmente os efeitos subletais provocados em *P. lineatus* devido à exposição aos metais Cd e Ni. Estudos futuros seriam importantes para avaliar se todos esses efeitos subletais poderiam ser mitigados com períodos de remediação maiores.

Palavras-chave: bioacumulação de metais; biomarcadores; mistura de metais; neurotoxicidade; osmorregulação.

BEZERRA, Vanessa. **Does phytoremediation attenuate cadmium and nickel effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*?** 2021. 98 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) and nickel (Ni) are metals that cause concern as environmental contaminants, because both of them induce various toxic effects on aquatic organisms. Phytoremediation mediated by the aquatic macrophyte *Lemna minor* is a possible alternative for the treatment of aquatic ecosystems contaminated by metals. Therefore, it is extremely important to assess whether this type of treatment attenuates the sublethal effects caused by exposure to metals, such as Cd and Ni. Thus, this study aimed to assess if the sublethal effects observed in *Prochilodus lineatus* due to Cd and Ni exposure, individually or in combination, are attenuated in the presence of the aquatic macrophyte *L. minor*. For this purpose, 96 h exposures to 20 µg L⁻¹ of Cd, 1.5 mg L⁻¹ of Ni and to the mixture of these two metals, in the presence or absence of *L. minor*, were performed. At the end of all exposures, samples of different tissues of *P. lineatus* were collected to compare the response of different biomarkers between animals exposed to metals in the presence or absence of *L. minor* on the water surface. We evaluated Cd and Ni bioaccumulation, metallothionein concentration, micronuclei and erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) frequency, acetylcholinesterase (AChE) activity, hematological and plasmatic parameters, besides to the activity of ionic transport enzymes and histological damage in the gills. The exposure only to Cd in the absence of *L. minor* caused bioaccumulation in several tissues, changes in AChE activity, reduction in the activity of gill ionic transport enzymes and ionic imbalances. Exposure only to Ni in the absence of macrophytes also caused bioaccumulation and ionic imbalances, in addition to metallothionein induction, an increased ENA frequency and morphological changes in the gills. Fish exposed to the metal mixture in the absence of *L. minor* showed all the sublethal effects observed in the exposures to single metals, besides to an increase in plasmatic glucose. Phytoremediation could prevent metal bioaccumulation in some tissues of *P. lineatus*, as well as hyperglycemia, changes in AChE activity and ENA frequency. However, morphological changes in the gills, ionic imbalances and bioaccumulation, especially in the gills, were not mitigated by phytoremediation. Therefore, we conclude that a 96-h phytoremediation mediated by the aquatic macrophyte *L. minor* partially attenuated the sublethal effects caused in *P. lineatus* due to Cd and Ni exposure. Future studies would be important to assess whether all these sublethal effects could be mitigated with longer remediations.

Key words: biomarkers; metal bioaccumulation; metal mixture; neurotoxicity; osmoregulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Efeitos que a exposição a um contaminante pode provocar nos diferentes níveis de organização biológica. Fonte: Adaptado de Mussali-Galante et al., 2013.17
- Figura 2.2** – Principais transportadores iônicos presentes nas CRM branquiais de teleósteos dulcícolas. Os cilindros azuis indicam canais; os círculos verdes indicam transportadores que necessitam de ATP; os hexágonos amarelos indicam trocadores que não necessitam de ATP; o retângulo cinza representa a enzima anidrase carbônica. Fonte: Baseado em Marshall, 2002.19
- Figura 2.3** – Esquema das principais alterações fisiológicas que ocorrem em peixes durante uma resposta de estresse. CRH = hormônio liberador de corticotrofina; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico. ↑ = aumento ou maior atividade; ↑↓ = indica que pode ocorrer tanto o aumento quanto a redução. Fonte: Adaptado de Schreck et al., 2016.21
- Figura 2.4** – Esquema da ação da acetilcolinesterase na fenda sináptica. Fonte: Adaptado de Araújo et. al, 2016.23
- Figura 2.5** – Esquema da formação de um micronúcleo por quebra do DNA **(A)** ou perda de um cromossomo **(B)** durante a mitose. Fonte: Baseado em Rocha, 2016.24
- Figura 2.6** – Representação esquemática da morfologia de eritrócitos que apresentam micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares. Fonte: Adaptado de Carrola et. al, 2014.25
- Figura 2.7** – Representação esquemática da morfologia branquial dos teleósteos. Fonte: Adaptado de Wegner, 2011.26
- Figura 2.8** – Corte histológico da estrutura dos filamentos branquiais do peixe *Prochilodus lineatus*, indicando os seus principais componentes: F = filamento; L = lamela; cp = célula pilar; e = célula epitelial pavimentosa; s = seio sanguíneo lamelar. Coloração com hematoxilina e eosina. Fonte: a própria autora.27

Figura 2.9 – Principais métodos de tratamento de efluentes e águas residuais. Fonte: Baseado em Vardhan et. al, 2019.	33
Figura 2.10 – Exemplares adultos de <i>Lemna minor</i> . Fonte: a própria autora.	36
Figura 2.11 – Exemplar juvenil de <i>Prochilodus lineatus</i> . Fonte: a própria autora.	37
Figura 3.1 – Concentração de cádmio em todos os aquários dos grupos Fito Cd e Cd, na exposição a este metal isolado (A) ; e nos grupos Fito Mix e Mix, na exposição à mistura de metais (B)	61
Figura 3.2 – Concentração de níquel em todos os aquários dos grupos Fito Ni e Ni, na exposição a este metal isolado (A) ; e nos grupos Fito Mix e Mix, na exposição à mistura de metais (B)	61
Figura 3.3 – Concentração de Cd nos tecidos de <i>P. lineatus</i> após exposição de 96 h ao Cd isolado (A) e após exposição de 96 h a mistura de cádmio e níquel (B) . Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 4-8). A concentração de cádmio estava abaixo do limite de detecção nos grupos em que não há uma barra e letras indicando o resultado da análise estatística.	62
Figura 3.4 – Concentração de Ni nos tecidos de <i>P. lineatus</i> após exposição de 96 h ao Ni isolado (A) e após exposição de 96 h a mistura de cádmio e níquel (B) . Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8). A concentração de níquel estava abaixo do limite de detecção nos grupos em que não há uma barra e letras indicando o resultado da análise estatística.	63
Figura 3.5 – Concentração de metalotioneínas (MT) nas brânquias, fígado e músculo de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd (A) ou ao Ni (B) isolados, ou ainda, à sua mistura (C) . Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	65
Figura 3.6 – Concentração de glicose plasmática em <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre	

	os grupos (média ± EP; n = 6-8).	65
Figura 3.7 –	Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ ATPase (A) , H ⁺ ATPase (B) Ca ²⁺ ATPase (C) e anidrase carbônica (D) nas brânquias de <i>P. lineatus</i> após 96 h de exposição ao Cd isolado. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	67
Figura 3.8 –	Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ ATPase (A) , H ⁺ ATPase (B) Ca ²⁺ ATPase (C) e anidrase carbônica (D) nas brânquias de <i>P. lineatus</i> após 96 h de exposição ao Ni isolado. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	68
Figura 3.9 –	Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ ATPase (A) , H ⁺ ATPase (B) Ca ²⁺ ATPase (C) e anidrase carbônica (D) nas brânquias de <i>P. lineatus</i> após 96 h de exposição à mistura de Cd e Ni. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	69
Figura 3.10 –	Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd (A) ou ao Ni (B) isolados, ou ainda, à sua mistura (C) . Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	70
Figura 3.11 –	Frequência alterações eritrocíticas nucleares (AENs) nos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).	70
Figura 3.12 –	Cortes histológicos das brânquias de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd (A) ou ao Ni (B) isolados, ou ainda, à sua mistura (C) . Desarranjo lamelar (+); descolamento epitelial (seta preta); hemorragia (*); hiperplasia do epitélio lamelar (seta branca); ruptura do epitélio lamelar (ponta de seta preta); rompimento das células pilares (ponta de seta branca). Coloração com hematoxilina e eosina.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Concentração de Cd e Ni em amostras de <i>L. minor</i> coletadas após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Um asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (média ± EP; n = 6-8).64
Tabela 3.2 –	Concentração de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos (RBC) avaliados em <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura (média ± EP; n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 6-8).66
Tabela 3.3 –	Concentração (mM) dos íons Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ e Ca ²⁺ no plasma de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).67
Tabela 3.4 –	Frequência de alterações histológicas e índice de alterações histológicas (IAH) nas brânquias de <i>P. lineatus</i> após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos quanto ao valor de IAH (média ± EP; n = 5-8). 0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente72
Tabela A.1 –	Concentração de Cd em todos os aquários do experimento de exposição ao cádmio isolado. <LD = abaixo do limite de detecção.94
Tabela A.2 –	Concentração de Ni em todos os aquários do experimento de exposição ao níquel isolado. <LD = abaixo do limite de detecção.95
Tabela A.3 –	Concentração de Cd e Ni em todos os aquários do experimento de exposição à mistura destes dois metais. <LD = abaixo do limite de detecção.96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anidrase carbônica
AChE	Acetilcolinesterase
AENs	Alterações eritrocíticas nucleares
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CaATP	Ca ²⁺ ATPase
Cd	Cádmio
Cl ⁻	Cloreto
CO ₂	Dióxido de carbono
CRM	Células ricas em mitocôndrias
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Cu ⁺	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
h	Horas
H ⁺	Próton
HATP	H ⁺ ATPase ou bomba de prótons
Hb	Hemoglobina
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
Hct	Hematócrito
IAH	Índice de alterações histológicas
K ⁺	Potássio
LC50	Concentração letal média para 50% dos organismos
Mg ²⁺	Magnésio
MN	Micronúcleo
MT	Metalotioneínas
n	Número de amostras
Na ⁺	Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

Ni	Níquel
NKA	Na ⁺ /K ⁺ ATPase ou bomba sódio-potássio
O ₂	Oxigênio molecular
Pi	Fosfato inorgânico
-SH	Grupo tiol ou sulfidril
RBC	Número de eritrócitos
U	Unidade
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	15
2	INTRODUÇÃO GERAL	16
2.1	METAIS COMO CONTAMINANTES DO AMBIENTE AQUÁTICO	16
2.2	BIOMARCADORES.....	17
2.2.1	Biomarcadores Osmo-Iônicos, Hematológicos e Metabólicos.....	18
2.2.2	Biomarcador de Exposição a Metais	21
2.2.3	Biomarcador de Neurotoxicidade	22
2.2.4	Biomarcadores de Genotoxicidade	23
2.2.5	Biomarcadores Histopatológicos	25
2.3	EFEITOS TÓXICOS DO CÁDMIO EM PEIXES	28
2.4	EFEITOS TÓXICOS DO NÍQUEL EM PEIXES	29
2.5	MISTURAS DE METAIS	31
2.6	FITORREMEDIAÇÃO DE METAIS	32
2.7	A MACRÓFITA AQUÁTICA LEMNA MINOR	34
2.8	O PEIXE PROCHILODUS LINEATUS COMO MODELO EXPERIMENTAL	36
2.9	OBJETIVOS E HIPÓTESE	38
2.9.1	Objetivo Geral	38
2.9.2	Objetivos Específicos	38
2.9.3	Hipótese	38
2.10	REFERÊNCIAS	39
3	CAPÍTULO 1. Manuscrito	50
3.1	RESUMO	50
3.2	INTRODUÇÃO	51
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.3.1	Animais Experimentais	53
3.3.2	Macrófitas Aquáticas	53
3.3.3	Preparação dos Meios de Exposição	54
3.3.4	Delineamento Experimental e Amostragem	54
3.3.5	Bioacumulação e Concentração de Metais nos Meios de Exposição	55
3.3.6	Biomarcador de Exposição a Metais	56

3.3.7	Biomarcadores Hematológicos, Metabólicos e Osmo-lônicos	56
3.3.8	Biomarcador de Neurotoxicidade	57
3.3.9	Biomarcadores de Genotoxicidade	58
3.3.10	Biomarcadores Histopatológicos	58
3.3.11	Análise Estatística	59
3.4	RESULTADOS	59
3.4.1	Concentração de Metais nos Meios de Exposição	60
3.4.2	Bioacumulação	60
3.4.3	Biomarcador de Exposição a Metais	64
3.4.4	Biomarcadores Hematológicos, Metabólicos e Osmo-lônicos	64
3.4.5	Biomarcador de Neurotoxicidade	68
3.4.6	Biomarcadores de Genotoxicidade	69
3.4.7	Biomarcadores Histopatológicos	71
3.5	DISCUSSÃO	74
3.5.1	Uso da Lemna minor para Fitorremediação	74
3.5.2	Exposição ao Cádmio Isolado	75
3.5.3	Exposição ao Níquel Isolado	77
3.5.4	Exposição à Mistura de Cádmio e Níquel	79
3.6	CONCLUSÃO	82
3.7	AGRADECIMENTOS	82
3.8	REFERÊNCIAS	82
4	CONCLUSÃO GERAL	92
	APÊNDICES	93
	APÊNDICE A – Concentração de metal nos meios de exposição.....	94
	ANEXOS	97
	ANEXO A – Normas de formatação	98

1. APRESENTAÇÃO

Este trabalho está organizado de forma a atender às normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para a defesa de dissertação. Primeiramente, há uma introdução geral para contextualização do tema abordado neste trabalho, bem como os objetivos gerais e específicos, além da hipótese levantada pela autora. Em seguida está o capítulo 1, que se refere ao manuscrito gerado a partir do projeto de pesquisa desenvolvido. Este capítulo está formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico *Aquatic Toxicology* (fator de impacto: 4,344). Por fim, são apontadas as conclusões gerais da dissertação. Informações suplementares do manuscrito estão disponíveis nos apêndices e, em anexo, encontram-se as normas para submissão ao periódico *Aquatic Toxicology*.

2. INTRODUÇÃO GERAL

2.1 METAIS COMO CONTAMINANTES DO AMBIENTE AQUÁTICO

A água é um recurso indispensável para a sobrevivência de todos os organismos. Porém, este recurso tem se tornado cada vez mais limitado, principalmente nos ecossistemas de água doce, devido a contaminação proporcionada por atividades humanas (Carolin et al., 2017).

Nesse contexto, os metais chamam atenção como um dos principais contaminantes presentes no ambiente aquático, sejam eles essenciais ou não essenciais (Nikinmaa, 2014). Os metais essenciais são necessários em baixas concentrações, para o funcionamento do metabolismo dos seres vivos, mas podem se tornar tóxicos quando excedem níveis fisiológicos. Os metais não-essenciais, por sua vez, não participam de nenhum processo fisiológico e podem ser tóxicos mesmo em baixas concentrações (Wood, 2011). Esses compostos podem entrar no ambiente por meio de fenômenos naturais, como erupções vulcânicas ou intemperismo de rochas (Iqbal et al., 2019), porém, existem indícios de que os ecossistemas sofrem pela liberação antrópica de metais desde o início da civilização humana (Couture e Pyle, 2011).

No entanto, a contaminação por metais não foi um problema em grande escala até o início da Revolução Industrial no século XVIII. A partir desse período, atividades como a mineração e a fundição de metais se intensificaram, de modo que a contaminação por metais se tornou uma ameaça ao meio ambiente (Couture e Pyle, 2011).

Atualmente, as atividades humanas que mais promovem a contaminação por metais, além da mineração e indústria de fundição de minério, incluem: lançamento de efluentes domésticos, consumo de combustíveis fósseis, incineração de resíduos sólidos, produção de energia, uso de fertilizantes, dentre outros (Nikinmaa, 2014; Iqbal et al., 2019). O grande consumo e o descarte incorreto de produtos eletrônicos também representam uma fonte de contaminação por metais, principalmente em países como o Brasil, onde não há tecnologia para a completa reciclagem de lixo eletrônico (de Oliveira et al., 2012).

Quando atingem o ambiente aquático, os metais podem se adsorver a partículas e formar complexos inorgânicos insolúveis, que provavelmente serão depositados

sobre o sedimento. No entanto, os metais também podem permanecer na coluna d'água enquanto ligados à matéria orgânica dissolvida, ou simplesmente na forma de íons livres (Couture e Pyle, 2011).

Quando os organismos aquáticos são expostos ao ambiente contaminado, os íons metálicos dissolvidos podem ser captados principalmente pelos epitélios presentes em superfícies de trocas e absorção, como brânquias e trato gastrointestinal. Como estes tecidos são muito vascularizados, os metais são rapidamente distribuídos a outros órgãos, se acumulando e provocando efeitos tóxicos (Nikinmaa, 2014). Nesse cenário, a poluição por metais representa um grande problema para a fauna aquática, que ainda precisa de solução (Nakbanpote et al., 2016).

2.2 BIOMARCADORES

Após a exposição a um contaminante, os organismos apresentam primeiramente respostas nos menores níveis de organização biológica, ou seja, ocorrem mudanças moleculares, celulares e fisiológicas (Fig. 2.1). Alterações nessa escala podem futuramente provocar efeitos morfológicos e comportamentais, e até mesmo atingir níveis biológicos mais altos, provocando efeitos irreversíveis em populações e comunidades (López-López e Sedeño-Díaz, 2015).

Figura 2.1 – Efeitos que a exposição a um contaminante pode provocar nos diferentes níveis de organização biológica. Fonte: Adaptado de Mussali-Galante et al., 2013.



Desse modo, avaliar alterações subindividuais após a exposição a um contaminante pode ser uma estratégia efetiva para detecção de efeitos tóxicos. Estas alterações atuam como um sinal de alerta, antes que ocorram danos irreversíveis a populações e comunidades no ambiente natural (López-López e Sedeño-Díaz, 2015).

Neste sentido, estudos ecotoxicológicos utilizam diversos biomarcadores, para avaliar os riscos que um contaminante representa aos organismos expostos. Esses biomarcadores podem ser definidos como alterações moleculares, bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser mensuradas em nível individual ou subindividual, e que fornecem evidências da exposição de um organismo a um ou mais contaminantes (Depledge, 1993).

2.2.1 Biomarcadores Osmo-lônicos, Hematológicos e Metabólicos

Por serem hiperosmóticos em relação ao meio em que vivem, os teleósteos dulcícolas enfrentam diversos desafios fisiológicos, como a perda de íons por difusão e a entrada de água por osmose. Para manter a sua osmolaridade esses animais liberam um grande volume de urina diluída e captam íons ativamente pelas brânquias (Evans et al., 2005; Bradley, 2009; Hwang, 2011).

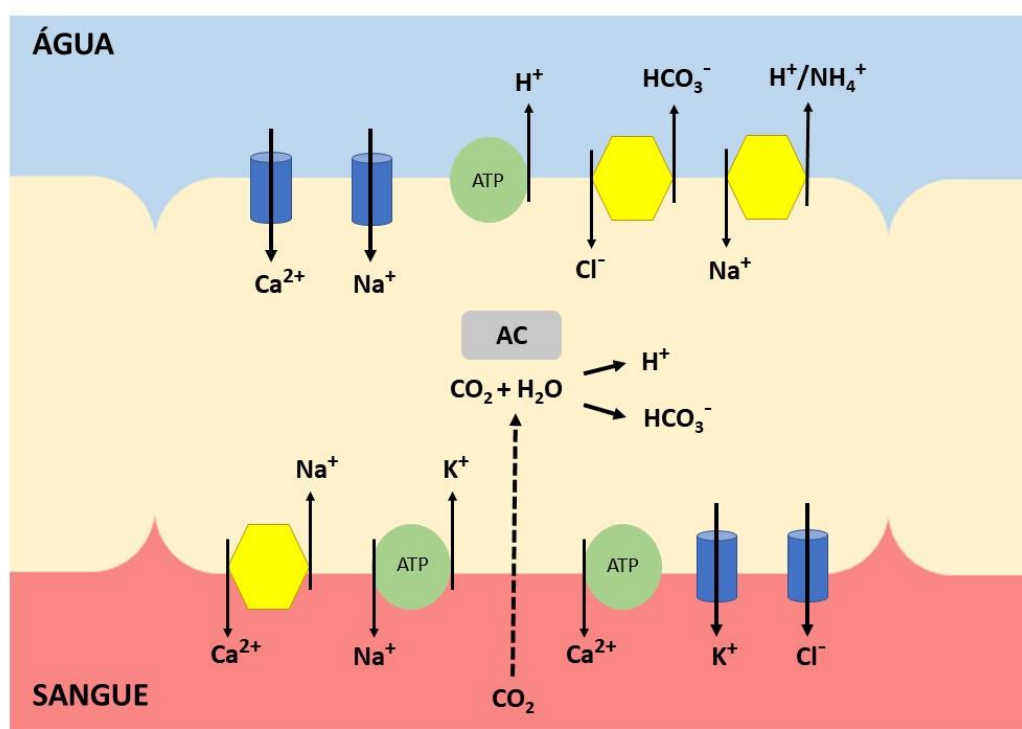
Os metais de maior importância para o funcionamento do metabolismo são o sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), ferro (Fe^{2+}), cobre (Cu^+) e zinco (Zn^{2+}). Os íons Na^+ e K^+ , por exemplo, precisam estar em concentrações adequadas para a condução de impulsos nervosos (Nikinmaa, 2014). O Ca^{2+} é um elemento importante na contração muscular, na composição do esqueleto ósseo, além de operar como mensageiro secundário intracelular (Brix et al., 2017). O ferro, o cobre e o zinco fazem parte de diversas proteínas e/ou atuam como co-fatores enzimáticos em muitos tecidos (Wood, 2011).

Para captar todos esses íons (além de outros macro e micronutrientes não citados), os peixes possuem transportadores e proteínas específicas na membrana plasmática das células ricas em mitocôndria (CRM) nas brânquias (Fig. 2.2). A Na^+/K^+ ATPase (NKA) é a principal enzima que regula os gradientes de sódio e potássio entre os meios intra e extracelular (Hill et al., 2012). A regulação das concentrações de cálcio ocorre principalmente por meio de canais de Ca^{2+} , trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e pela enzima Ca^{2+} ATPase (CaATP) (Hwang, 2011).

Todavia, deve-se destacar que os processos envolvidos na manutenção do equilíbrio ácido-básico também estão intimamente ligados a osmorregulação, uma vez

que os íons Na^+ e Cl^- são constantemente trocados por H^+ e HCO_3^- , respectivamente. Neste contexto, a enzima anidrase carbônica (AC) possui um papel fundamental, pois ela catalisa a reação de hidratação do CO_2 , resultando na formação do ácido carbônico, que se dissocia em H^+ e HCO_3^- (Gilmour e Perry 2009).

Figura 2.2 - Principais transportadores iônicos presentes nas CRM branquiais de teleosteos dulcícolas. Os cilindros azuis indicam canais; os círculos verdes indicam transportadores que necessitam de ATP; os hexágonos amarelos indicam trocadores que não necessitam de ATP; o retângulo cinza representa a enzima anidrase carbônica. Fonte: Baseado em Marshall, 2002.



Exposições agudas e crônicas a metais podem afetar diretamente todos esses transportadores, provocando desequilíbrios iônicos, alterações no equilíbrio ácido-básico e conseqüentemente, comprometendo a saúde dos animais (Nikinmaa, 2014; Amiard-Triquet et al., 2015). Uma vez que as brânquias estão continuamente em contato com o meio externo, as enzimas deste tecido se mostram ainda mais sensíveis à exposição a metais, em comparação a outros tecidos. Desse modo, alterações na atividade da NKA e da CaATP branquiais podem ser utilizadas como sinal de alerta para possíveis disfunções iônicas mais graves (Atli e Canli, 2011).

Além de desequilíbrios iônicos, a exposição a metais pode provocar danos estruturais no tecido branquial, reduzindo a captação de oxigênio (Bjerregaard et al.,

2015). Como consequência podem ocorrer alterações em parâmetros hematológicos, como uma resposta de compensação, uma vez que a proteína hemoglobina, presente no interior dos eritrócitos, é a principal responsável pelo transporte de O₂ na corrente sanguínea (Harter e Brauner, 2017). Os metais também podem inibir o processo de eritropoiese ou provocar danos diretamente aos eritrócitos, acelerando o processo de hemólise dessas células, o que resultaria num quadro de anemia nos organismos expostos (Witeska, 2015).

Outro efeito que pode ser provocado pela exposição a metais é a resposta de estresse. Trata-se de uma resposta estereotipada, comumente desencadeada nos vertebrados quando um organismo enfrenta condições em que os mecanismos fisiológicos usuais não conseguem manter a homeostase (Schreck et al., 2016).

Essa resposta se inicia pela liberação das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, além do cortisol, um corticosteroide. Estes hormônios alteram o padrão de distribuição do oxigênio e de moléculas que atuam como fonte de energia, como a glicose. Estes recursos são então disponibilizados em maior quantidade para os tecidos, a fim de que o organismo supere a condição de estresse (Schreck et al., 2016).

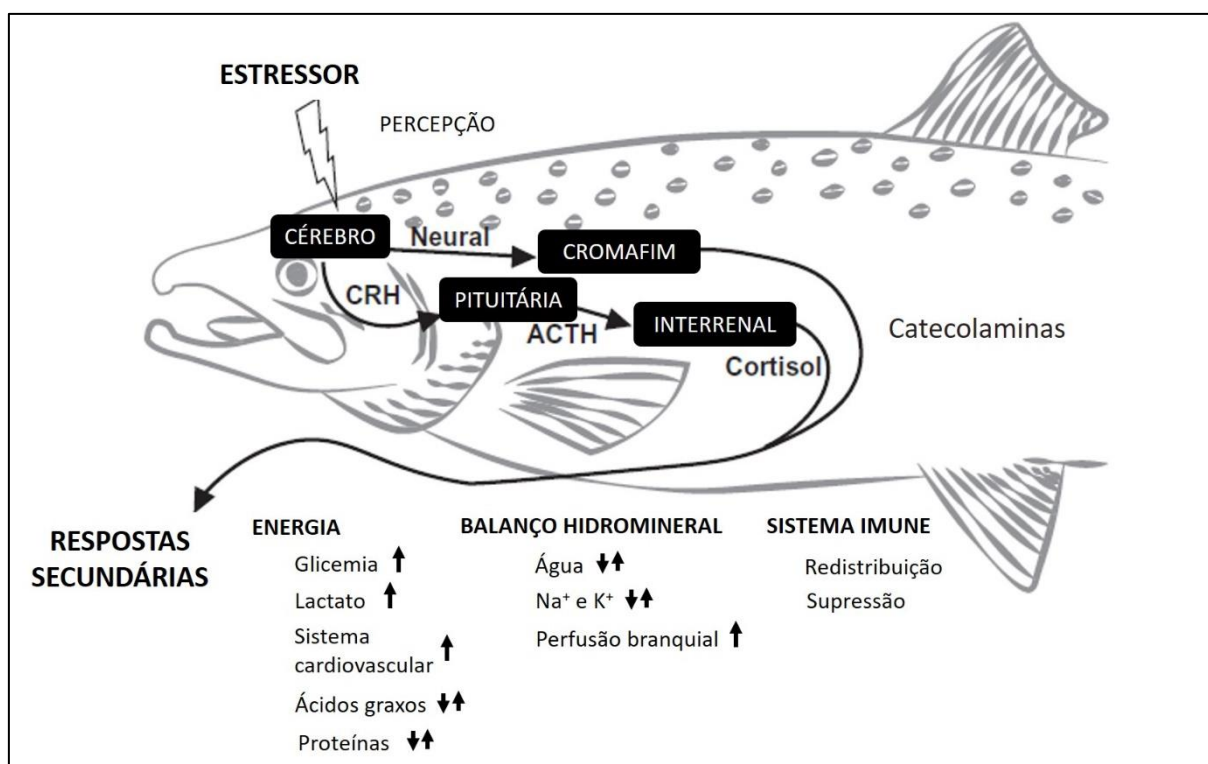
Dessa forma, a resposta de estresse provoca algumas alterações fisiológicas características (Fig. 2.3), como o aumento da glicemia, precedida pela quebra das reservas de glicogênio hepático. Assim, a glicose se mantém prontamente disponível para a musculatura esquelética (Schreck et al., 2016). Também ocorre uma maior disponibilização de eritrócitos na corrente sanguínea, o que aumenta a eficiência do transporte e distribuição do oxigênio no organismo (Reid, 2011).

Outra resposta característica em peixes é o aumento do aporte sanguíneo nas brânquias, para maior captação de O₂. No entanto, este aumento na perfusão branquial pode provocar prejuízos ao processo de osmorregulação, devido ao maior influxo de água para o meio interno e à perda de íons para o meio externo (Reid, 2011; Wendelaar Bonga, 2011). Neste contexto, o cortisol tem um papel importante na manutenção do equilíbrio hidromineral, induzindo a diferenciação de CRM branquiais e o aumento da atividade de enzimas envolvidas no transporte iônico (Wendelaar Bonga, 2011).

Considerando todos estes fatores, o aumento da glicose plasmática pode ser uma importante indicação de uma resposta de estresse. Além disso, a avaliação de parâmetros sanguíneos como a concentração de hemoglobina, número de eritrócitos

e hematócrito se mostram como bons biomarcadores para avaliar o estado geral de saúde dos peixes, uma vez que estes parâmetros podem se alterar devido à resposta de estresse e/ou exposição a metais.

Figura 2.3 - Esquema das principais alterações fisiológicas que ocorrem em peixes durante uma resposta de estresse. CRH = hormônio liberador de corticotrofina; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico. ↑ = aumento ou maior atividade; ↑↓ = indica que pode ocorrer tanto o aumento quanto a redução. Fonte: Adaptado de Schreck et al., 2016.



2.2.2 Biomarcador de Exposição a Metais

As metalotioneínas (MT) são uma família de proteínas de baixo peso molecular, que estão presentes no citoplasma celular e contém grandes quantidades do aminoácido cisteína em sua composição. Estas proteínas estão presentes em quase todos os organismos vivos, como principal mecanismo de defesa à toxicidade dos metais, e por isso, são comumente utilizadas na ecotoxicologia como biomarcadores que indicam a exposição a metais (Nikinmaa, 2014; Le Croizier et al., 2018).

Quando ocorre uma alta captação e/ou armazenamento de metais em determinado tecido, um aumento na concentração de MT pode ser induzido (Kennedy, 2011). Nestas proteínas, os grupamentos sulfidríla (-SH) presentes na cisteína formam um complexo com íons metálicos, o que resulta numa menor disponibilidade e

toxicidade ao organismo em questão (Davidson et al., 2015).

Esse mecanismo de formação de complexos também é de extrema importância para a regulação das concentrações de metais essenciais, que participam do metabolismo dos seres vivos. Contudo, a exposição a metais não essenciais pode interferir nesta via de regulação. Sabe-se que o cádmio e o chumbo, por exemplo, podem deslocar o Zn^{2+} do seu sítio de ligação às MT, resultando em prejuízos para a regulação deste íon (Davidson et al., 2015).

Desse modo, a concentração de MT se mostra como um biomarcador relevante para estudos ecotoxicológicos com exposições a metais, sejam eles essenciais ou não-essenciais.

2.2.3 Biomarcador de Neurotoxicidade

A neurotoxicidade pode ser definida como uma situação na qual alguma função do sistema nervoso central ou periférico é prejudicada devido à exposição a qualquer tipo de agente químico (Nikinmaa, 2014).

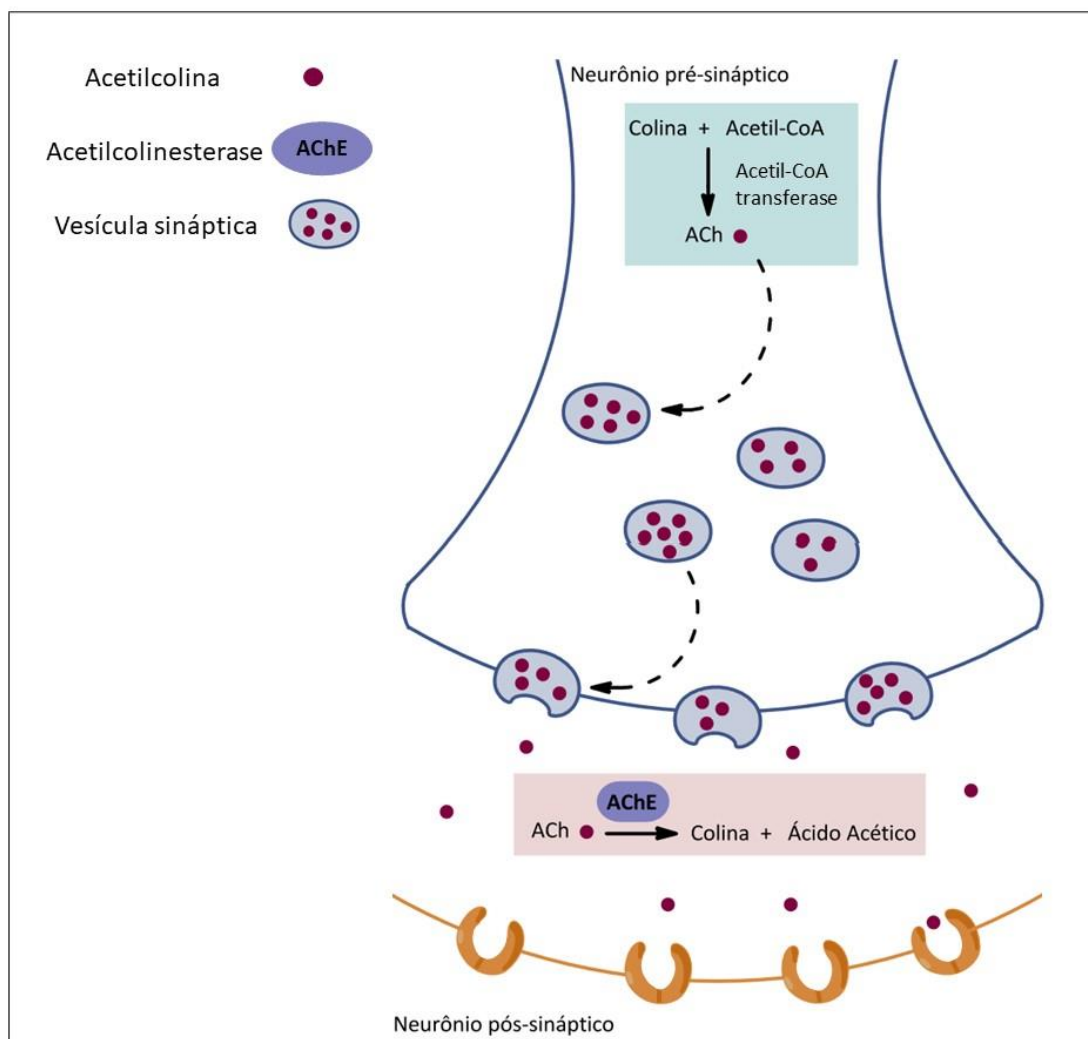
Na ecotoxicologia, alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) se mostram como um importante biomarcador de neurotoxicidade. Dentre as suas principais vantagens podemos citar a sua sensibilidade a diversos tipos de xenobióticos, é uma enzima presente em vários organismos, dos mais diversos ecossistemas, além disso, a sua atividade pode ser mensurada por métodos simples e de baixo custo (Nunes, 2011).

Nos organismos, a acetilcolinesterase atua de forma importante nas sinapses colinérgicas (Fig. 2.4). Nas junções neuromusculares, por exemplo, a acetilcolina é o principal neurotransmissor secretado pelos neurônios pré-sinápticos. Durante uma sinapse, o neurotransmissor liberado na fenda sináptica se liga a canais iônicos nas membranas pós-sinápticas, o que resulta na abertura de canais de sódio que promovem a despolarização e excitação da célula pós-sináptica. Neste processo, a acetilcolinesterase tem suma importância, pois ela hidrolisa a acetilcolina, impedindo a excitação constante da célula pós-sináptica (Nikinmaa, 2014; Pereira et al., 2019), o que poderia resultar em tetania, paralisia ou até mesmo, a morte do animal.

Desse modo, a AChE se mostra como um biomarcador de grande relevância ecológica, uma vez que o aumento ou a redução da atividade desta enzima, devido à exposição a um contaminante, podem resultar em alterações de parâmetros fisiológicos e comportamentais. Estas alterações podem oferecer sérios riscos a

sobrevivência de toda a população dos organismos expostos, prejudicando funções essenciais como reprodução, migração e fuga de predadores, no ambiente natural (Nunes, 2011).

Figura 2.4 - Esquema da ação da acetilcolinesterase na fenda sináptica. Fonte: Adaptado de Araújo et al., 2016.



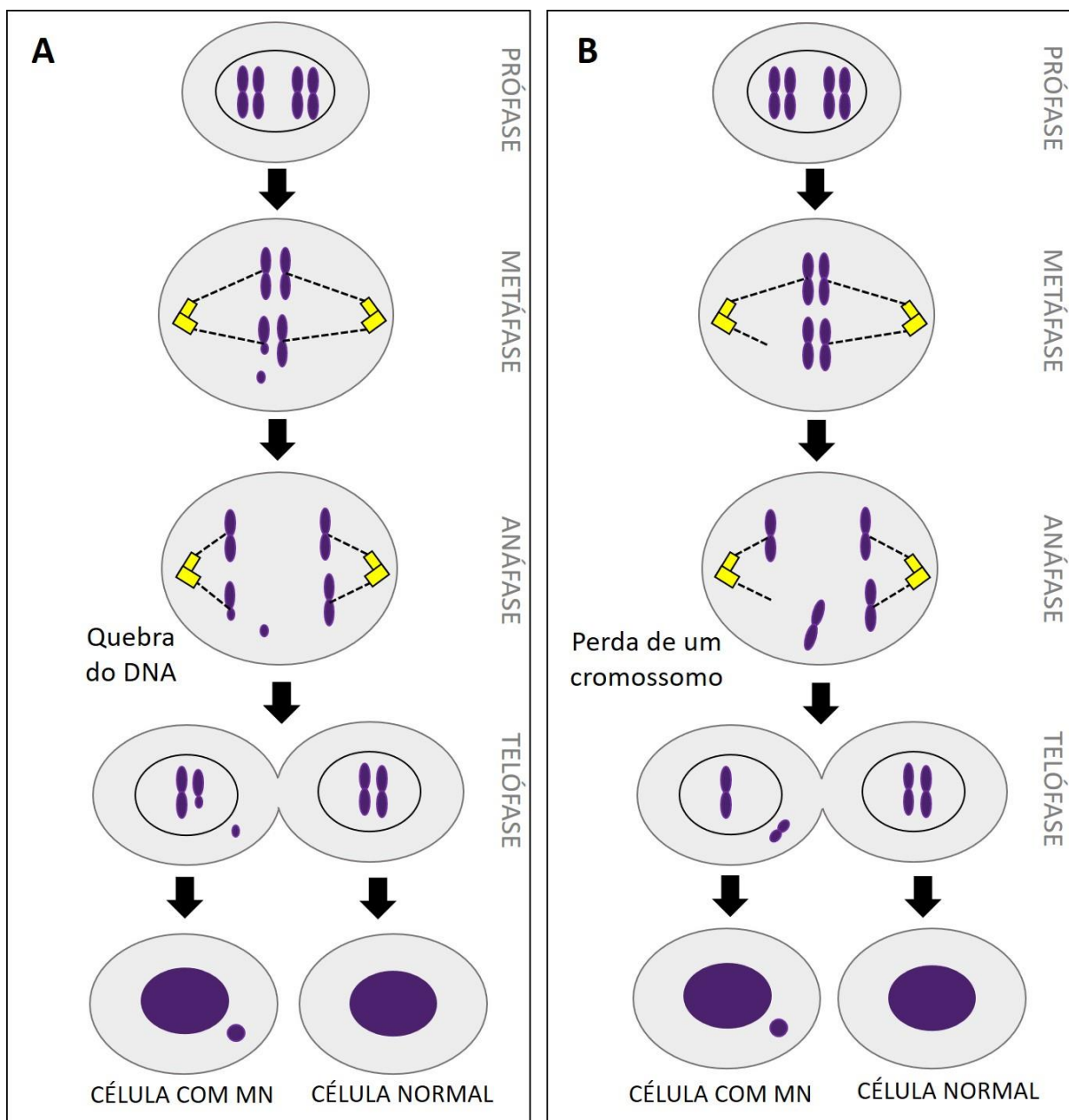
2.2.4 Biomarcadores de Genotoxicidade

A avaliação de danos genotóxicos é muito importante num estudo ecotoxicológico, uma vez que a genotoxicidade pode provocar efeitos carcinogênicos e prejuízos à reprodução dos organismos (Farag e Alagawany, 2018). Diversos trabalhos na literatura já demonstraram que os metais são compostos capazes de provocar efeitos genotóxicos em peixes (Monteiro et al., 2011; Palermo et al., 2015; Simonato et al., 2016).

Os efeitos genotóxicos podem ser avaliados através do teste do micronúcleo, um

ensaio muito utilizado em estudos de campo e laboratório, por sua fácil execução em eritrócitos (Farag e Alagawany, 2018). O micronúcleo (MN) é uma estrutura formada ao final do processo de divisão celular, quando um cromossomo inteiro, ou parte deste, não se integra ao núcleo das células filhas (Fig. 2.5). Essa situação pode ocorrer devido à fragmentação de material genético ou a um erro no funcionamento do fuso mitótico. Como consequência, um pequeno núcleo se forma próximo ao núcleo principal (Udroiu, 2006).

Figura 2.5 - Esquema da formação de um micronúcleo por quebra do DNA **(A)** ou perda de um cromossomo **(B)** durante a mitose. Fonte: Baseado em Rocha, 2016.



Porém, em peixes, quando um MN se forma durante o processo de divisão celular relacionado a eritropoiese, ainda serão necessários até 5 dias para que os eritrócitos em questão sejam liberados para a corrente sanguínea. Desse modo, um aumento da frequência de MN em eritrócitos dificilmente ocorre devido a exposições agudas (Udroiu, 2006). Este efeito só ocorreria se um contaminante interferisse nos processos de reparo responsáveis pela remoção de células com MN da corrente sanguínea, o que provocaria um aumento da frequência dessas estruturas mesmo em curtos períodos de exposição (Nikinmaa, 2014).

Paralelamente a quantificação da frequência de MN, alterações na forma do núcleo celular também podem ser avaliadas (Fig. 2.6), sendo então denominadas como alterações eritrocíticas nucleares (AENs) (Bolognesi e Hayashi, 2011).

O aumento da frequência de AENs também pode indicar a ocorrência de danos genotóxicos, pois acredita-se que elas se formam devido a processos de reparo e eliminação de material genético danificado, por mecanismos de excitose (Shimizu et al., 1998).

Contudo, existe uma outra hipótese de que estas deformidades ocorram devido a alterações na permeabilidade da membrana nuclear, em resposta ao aumento de danos oxidativos a lipídeos (Seriani et al., 2011). Desse modo, ainda há dúvida se a ocorrência de AENs pode ser considerada um efeito genotóxico.

Figura 2.6 – Representação esquemática da morfologia de eritrócitos que apresentam micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares. Fonte: Adaptado de Carrola et al., 2014.



2.2.5 Biomarcadores Histopatológicos

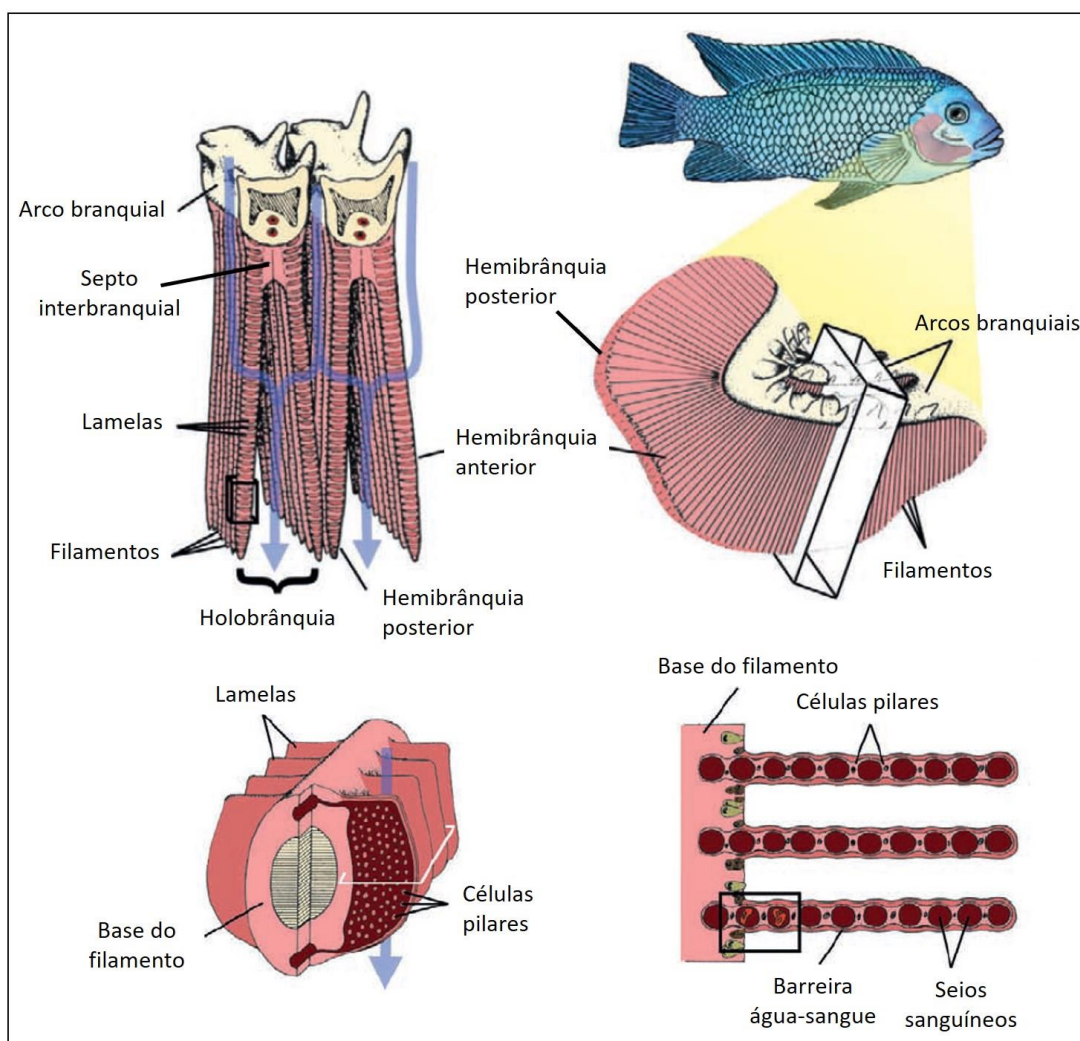
A avaliação de alterações histológicas é uma ferramenta importante na ecotoxicologia para detectar efeitos deletérios em tecidos específicos após a exposição a um contaminante. Estas alterações podem modificar a estrutura do

tecido, resultando em patologias que impedem o seu funcionamento (Schlenk et al., 2008).

Nos peixes, as brânquias são o principal órgão envolvido na captação de oxigênio, apresentando uma grande superfície em contato contínuo com o meio externo. Desse modo, este tecido, em específico, apresenta grande sensibilidade a presença de contaminantes na água (Au, 2004; Wegner, 2011).

Em sua estrutura, as brânquias dos teleósteos são constituídas por 4 arcos em cada lado da cavidade opercular. Cada arco possui duas fileiras de filamentos branquiais, conectados apenas na base pelo septo interbranquial. Os dois lados de cada filamento apresentam inúmeras dobras em sua superfície, chamadas de lamelas (Fig. 2.7) (Wegner, 2011).

Figura 2.7 – Representação esquemática da morfologia branquial dos teleósteos. Fonte: Adaptado de Wegner, 2011.

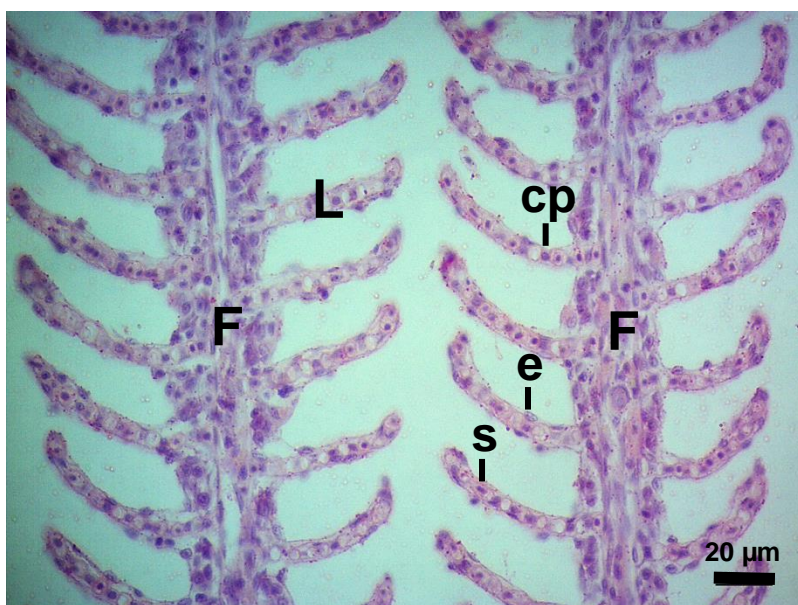


A superfície das lamelas, por sua vez, é constituída principalmente por 3 tipos celulares: as células epiteliais pavimentosas, que recobrem a superfície branquial; as células mucosas, responsáveis pela secreção de muco; e as células ricas em mitocôndrias, que atuam principalmente no transporte de íons entre o meio interno e externo (Bradley, 2009). O interior das lamelas é constituído pelas células pilares (Fig. 2.8), um tipo celular que apresenta dois prolongamentos em cada lado, que quando em contato com as células vizinhas formam canais pelos quais o sangue circula em direção oposta à corrente de água no ambiente externo (Wegner, 2011).

A exposição a contaminantes pode provocar alterações na estrutura das lamelas branquiais, como por exemplo, a hiperplasia no epitélio branquial, ocasionada pelo crescimento exagerado do tecido; o acúmulo de líquidos, que resulta na formação de edemas; a fusão de lamelas vizinhas, que também ocorre devido ao crescimento exagerado do tecido; dentre outras diversas histopatologias (Nilsson, 2011).

Inicialmente, essas modificações são protetivas, uma vez que aumentam a distância entre o contaminante presente na água e o interior do organismo. Entretanto, cronicamente elas se tornam prejudiciais por comprometerem os mecanismos respiratórios e osmorregulatórios, devido ao aumento da distância de difusão (Nilsson, 2011; Nikinmaa, 2014).

Figura 2.8 – Corte histológico da estrutura dos filamentos branquiais do peixe *Prochilodus lineatus*, indicando os seus principais componentes: F = filamento; L = lamela; cp = célula pilar; e = célula epitelial pavimentosa; s = seio sanguíneo lamelar. Coloração com hematoxilina e eosina. Fonte: a própria autora.



2.3 EFEITOS TÓXICOS DO CÁDMIO EM PEIXES

O cádmio (Cd) é um metal não-essencial, que mesmo em concentrações muito baixas (na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$) já pode provocar toxicidade (McGeer et al., 2011; Carolin et al., 2017). Naturalmente, esse metal é encontrado em afloramentos minerais, em conjunto com outros elementos como fosfato e zinco. É um metal muito utilizado em indústrias de galvanização e na fabricação de baterias, estabilizadores, tintas e ligas metálicas. Também é comumente encontrado como resíduo de fertilizantes agrícolas fosfatados (Nikinmaa, 2014; Carolin et al., 2017). A mineração e a emissão de efluentes e esgoto doméstico durante produção, uso e descarte de todos esses produtos provoca a contaminação dos recursos hídricos, e conseqüentemente, a ocorrência de efeitos tóxicos nos organismos que ali vivem.

Em peixes, a toxicidade aguda do Cd envolve principalmente distúrbios na homeostase dos íons Ca^{2+} e Na^+ . Em sua forma iônica divalente (Cd^{2+}), o cádmio é captado pelas brânquias através de canais de cálcio (McGeer et al., 2011). Assim, desbalanços iônicos ocorrem devido à competição do Cd^{2+} com o Ca^{2+} nos canais de cálcio localizados na membrana apical e pelos sítios de ligação da enzima CaATP, localizada na membrana basolateral das células ricas em mitocôndria. Essa competição promove uma redução na concentração de cálcio plasmático e acúmulo de Cd nos tecidos (Verboost et al., 1988; McGeer et al., 2011). A hipocalcemia acaba levando o animal à morte devido a impossibilidade do funcionamento das contrações musculares e de diversas funções do sistema nervoso (Wood, 2011).

Os distúrbios relacionados ao Na^+ podem ocorrer devido à inibição da enzima NKA (McGeer et al., 2011). No estudo de Atli e Canli (2013), o peixe *Oreochromis niloticus* apresentou alterações na atividade dessa enzima, após exposições de 96 h a diferentes concentrações de Cd. Todas as concentrações testadas (0,1; 0,5; 1 e 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) provocaram uma redução na atividade da NKA nas brânquias e no rim. Além disso, também foram observadas reduções na atividade da CaATP nas brânquias, rim e músculo.

No trabalho de da Silva e Martinez (2014), juvenis de *Prochilodus lineatus* expostos às concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por 24 e 96 h apresentaram uma redução na concentração de cálcio plasmático. Neste mesmo trabalho, também foi observada uma diminuição na atividade das enzimas NKA, CaATP e anidrase carbônica, além de um aumento da atividade da H^+ ATPase, nas brânquias e no rim

dos peixes.

Cronicamente, além dos desbalanços iônicos, o Cd pode causar bioacumulação e estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser provocado pela ligação do Cd ao complexo III da cadeia de transporte de elétrons (CTE), localizada nas mitocôndrias. Essa ligação prejudica o funcionamento da CTE, resultando no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Wang et al., 2004; McGeer et al., 2011).

Alterações no sistema imunológico e endócrino, alterações no comportamento, reprodução e crescimento, além do desenvolvimento de histopatologias, principalmente nas brânquias, fígado e rins, também são descritos na literatura como efeitos crônicos da exposição ao Cd. Entretanto, ainda não é claro se esse efeitos seriam provocados diretamente pela ação do Cd ou se seriam resultado de alterações como estresse oxidativo e disfunções iônicas (McGeer et al., 2011).

Alguns desses efeitos citados puderam ser observados no trabalho de Cao et al. (2012). Neste estudo, juvenis de *Paralichthys olivaceus* foram expostos por 28 dias a altas concentrações de Cd (2, 4 e 8 mg L⁻¹). Ao final da exposição, as duas maiores concentrações provocaram um aumento da peroxidação lipídica nas brânquias e no fígado, além de alterações em diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Neste mesmo estudo, todas as concentrações testadas provocaram acúmulo de Cd nas brânquias, fígado, rim e músculo.

No trabalho de Pereira et al. (2016), após 15 dias de exposição às concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µg L⁻¹ o Cd provocou estresse oxidativo no fígado e no rim, alterações em parâmetros hematológicos, aumento da frequência de alterações eritrocíticas nucleares e aumento de lesões histopatológicas no fígado do peixe *Rhamdia quelen*.

2.4 EFEITOS TÓXICOS DO NÍQUEL EM PEIXES

O níquel (Ni) é um metal essencial para plantas, microorganismos e alguns animais terrestres. Entretanto, em animais aquáticos, ainda não foi possível detectar nenhuma biomolécula que contenha Ni em sua composição. Os estudos que tentam provar a essencialidade desse metal trazem apenas evidências circunstanciais, desse modo, ainda não há um consenso na literatura sobre este tema (Pyle e Couture, 2011).

Quanto ao uso antrópico desse metal, podemos citar a sua importância na indústria para catálises químicas, galvanoplastia e produção de diversos produtos

como aço e outras ligas metálicas, baterias, componentes eletrônicos, ferramentas e utensílios domésticos. Diariamente, utilizamos diversos itens que contém esse metal, como moedas, joias, relógios, armação de óculos, aparelhos ortodônticos, entre outros (Klein e Costa, 2015). Desse modo, o extenso uso do Ni, nos mais diversos produtos, acaba provocando a contaminação do ambiente aquático e problemas para a fauna e flora residentes (Carolin et al., 2017).

Em valores de pH normalmente encontrados em sistemas de água doce, a forma iônica mais comum do níquel é o Ni^{2+} , a sua condição mais tóxica (Pyle e Couture, 2011). Ao contrário da maioria dos metais, a toxicidade aguda e crônica do Ni não está relacionada principalmente a distúrbios osmorregulatórios, mas sim a danos histológicos nas brânquias. Os danos ao tecido branquial se tornam graves o suficiente para impedir a captação de O_2 , levando o animal a morte por hipóxia (Pane et al., 2003). Todavia, o Ni apresenta baixa toxicidade em exposições agudas, se comparado a outros metais, uma vez que os valores de LC_{50} em 96 h para peixes estão na escala de mg L^{-1} (Pyle e Couture, 2011).

Alterações hematológicas também podem ser observadas em peixes expostos ao Ni, como resposta ao estado de hipóxia provocado pelo metal. No trabalho de Pane et al. (2003), *Oncorhynchus mykiss* expostos por 72 e 96 h a $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni apresentaram um aumento do hematócrito, uma resposta fisiológica que melhoraria a capacidade de transporte de oxigênio pela corrente sanguínea.

O metabolismo de carboidratos também pode sofrer alterações após exposições ao Ni, como consequência da hipóxia e não devido a uma resposta de estresse. Durante a hipóxia, os animais podem aumentar a produção anaeróbica de ATP, devido à falta de oxigênio. Como esse mecanismo de produção é menos eficiente e consome mais glicose, ocorre uma mobilização e quebra de glicogênio muscular e hepático, que leva ao aumento de glicemia e supre a demanda de glicose para produção de ATP (Pyle e Couture, 2011).

Essa resposta foi observada no trabalho de Kubrak et al. (2012), no qual o peixe *Carassius auratus* apresentou aumento de glicose plasmática e redução nas reservas de glicogênio hepático e muscular, após 96 h de exposição a 10, 25 e 50 mg L^{-1} de Ni.

Estresse oxidativo é outro efeito comumente observado após exposições agudas ou crônicas ao Ni. No trabalho de Palermo et al. (2015) juvenis de *P. lineatus* expostos por 96 h ao Ni nas concentrações de 25, 250 e $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram danos

oxidativos e alterações em diversos antioxidantes nas brânquias e no fígado. Os peixes também apresentaram acúmulo de Ni nas brânquias, fígado, rim e músculo, além de danos genotóxicos nas brânquias e nos eritrócitos.

Blewett et al. (2016) observaram um aumento de danos oxidativos em proteínas nas brânquias e no fígado de *Galaxias maculatus* expostos ao Ni nas concentrações de 150 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h, em diferentes salinidades. Acúmulo de Ni nas brânquias, intestino e carcaça foi outro efeito constatado pelos autores.

Exemplares de *O. mykiss*, quando expostos por 21 dias às concentrações de 1 e 2 mg L^{-1} de Ni, também apresentaram danos oxidativos, além de alterações histopatológicas no cérebro, brânquias, fígado e rim (Topal et al., 2015; 2017).

Mesmo sendo um fenômeno comum, ainda não se sabe exatamente como o Ni promove estresse oxidativo em organismos aquáticos como os peixes (Topal et al., 2017). Segundo Zheng et al. (2013), exposições ao Ni provocam estresse oxidativo devido a inibição da atividade de enzimas antioxidantes. Contudo, segundo Brix et al. (2017), o Ni pode interferir no metabolismo celular, induzindo respostas fisiológicas à hipóxia mesmo em condições de normóxia. Esta situação resultaria em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo.

2.5 MISTURAS DE METAIS

Estudos ecotoxicológicos geralmente focam na exposição a um único metal, ou a vários metais isolados, para que se possa compreender os efeitos específicos de cada contaminante. Porém, trabalhos com esse tema não são muito representativos em relação ao ambiente natural, no qual os organismos estão expostos a uma mistura de diversos tipos de contaminantes (Barbee et al., 2014).

Em uma mistura, os diferentes compostos podem simplesmente não interagir, de modo que a toxicidade aos organismos expostos poderá ser a soma dos efeitos de cada contaminante. Caso haja interação entre os compostos, podem ser estabelecidas relações de antagonismo ou agonismo. Nas interações antagônicas, um composto provoca a redução da toxicidade do outro, devido a processos como inibição alostérica ou competição. Já no agonismo, um composto aumenta a toxicidade de outro, de modo que há um aumento da afinidade deste segundo composto a sítios de ligação enzimática, por exemplo (Nikinmaa, 2014).

A mistura de Cd e Ni foi selecionada para este estudo devido ao extenso uso

destes dois metais na fabricação de baterias (Carolin et al., 2017), e consequentes riscos para o ambiente devido ao descarte incorreto desses produtos. Diversos países já desenvolveram legislações para minimizar o impacto das baterias Ni-Cd através da sua reciclagem. Na União Europeia, por exemplo, 7000 toneladas de baterias Ni-Cd foram recolhidas para reciclagem em 2018, com uma taxa de eficiência de 75 a 85% na reciclagem deste tipo de bateria (Eurostat, 2020).

No Brasil, a resolução CONAMA 401 estabelece normas sobre o descarte de baterias, determinando que os fabricantes e importadores devem ser responsáveis pelo recolhimento e destinação adequada das baterias ao final da sua vida útil (Brasil, 2008). Porém, estima-se que o consumo anual de baterias no Brasil seja de 1,2 bilhões de unidades e que apenas 1% desse material é reciclado do modo correto (Vieceli et al., 2015).

Apesar dessa problemática ligada ao descarte incorreto de baterias e a contaminação por metais, ainda não são claros os efeitos da mistura de Cd e Ni em organismos aquáticos, de acordo com a literatura disponível. No estudo de Niyogi et al. (2015), após uma exposição de 3 h não foi observada interação entre o Cd e o Ni nos sítios de ligação nas brânquias do peixe *O. mykiss*. Porém, no trabalho de Dew et al. (2016) o Ni atenuou efeitos subletais do Cd em *O. mykiss* após 96 h de exposição.

No trabalho de Komjarova e Blust (2009) o Cd provocou uma redução da captação de Ni em zebrafish (*Danio rerio*). Neste mesmo estudo, as menores concentrações de Ni testadas também reduziram a captação de Cd nas brânquias e no corpo todo, enquanto que a maior concentração de Ni avaliada aumentou a captação de Cd.

No microcrustáceo *Daphnia magna*, concentrações baixas de Ni ($< 80 \mu\text{g L}^{-1}$) também reduziram a toxicidade do Cd. Porém, quando determinada concentração de Ni era excedida, este metal passava a contribuir com o aumento da toxicidade (Pérez e Hoang, 2018).

2.6 FITORREMEDIAÇÃO DE METAIS

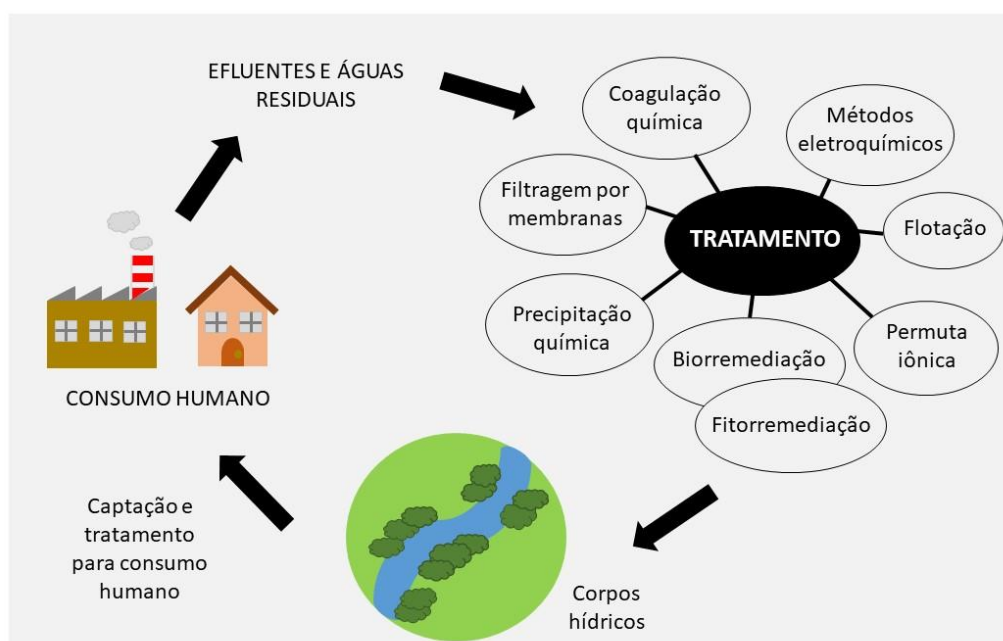
O problema provocado pela poluição por metais é muito grave, principalmente devido à persistência desses compostos no ambiente e nas cadeias alimentares. Assim, esta situação exige o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, que permitam a eliminação desses compostos, sem a geração de mais resíduos (Asad et

al., 2019).

Várias técnicas físico-químicas já foram desenvolvidas para remoção de metais, como a coagulação química, tratamento eletroquímico, flotação, filtração por membranas, precipitação química e permuta iônica (Fig. 2.6). Porém, a maior parte desses tratamentos são muito caros e/ou geram poluição secundária pela formação de lodo, ferrugem, ou uso de muitos produtos químicos (Carolin et al., 2017).

Nesse contexto, técnicas de biorremediação, como a fitorremediação, por exemplo, surgem como uma alternativa mais segura para a remoção de metais (Asad et al., 2019). A fitorremediação pode ser definida como um tipo de biorremediação no qual plantas são usadas para degradar ou imobilizar contaminantes do solo ou da água, reduzindo assim seus efeitos tóxicos (Iqbal et al., 2019). Esta técnica tem se mostrado efetiva, oferecendo uma alternativa sustentável e de baixo custo para a remoção de metais, e de outros contaminantes (Iqbal et al., 2019).

Figura 2.9 - Principais métodos de tratamento de efluentes e águas residuais. Fonte: Baseado em Vardhan et al., 2019.



Outro aspecto favorável ao uso da fitorremediação é a possibilidade da geração de benefícios econômicos. As plantas utilizadas podem ser incineradas, o que permite a recuperação dos metais extraídos e a sua reutilização pela indústria (Nakbanpote et al., 2016; Iqbal et al., 2019). Além disso, também se tem estudado a possibilidade do uso dessa biomassa vegetal para compostagem, compactação, pirólise e produção

de biogás (Ghosh e Singh, 2005; Nakbanpote et al., 2016).

Existem diversos mecanismos pelos quais a fitorremediação de metais pode ocorrer, como, por exemplo, a fitoestabilização, a fitoacumulação e a fitovolatilização (Nakbanpote et al., 2016). A fitoestabilização envolve a imobilização ou o “sequestro” dos metais presentes no solo ou na água através da sua adsorção na superfície das raízes (Iqbal et al., 2019; Jeevanantham et al., 2019). Na fitoacumulação, também conhecida como fitoextração, contaminantes como os metais são absorvidos pelas plantas e armazenados em seus tecidos (Iqbal et al., 2019). Na fitovolatilização contaminantes como o selênio e o mercúrio, são captados pelas plantas e, em seguida, durante o processo de transporte das raízes para as folhas, sofrem modificações para se tornarem menos tóxicos e mais solúveis em água. Por fim, o contaminante é volatilizado e liberado para a atmosfera através das folhas. (Jeevanantham et al., 2019).

Fatores ambientais como características do solo, ou da água, e o tipo de contaminante presente podem afetar a eficácia e os mecanismos utilizados no processo de fitorremediação (Iqbal et al., 2019).

A identificação da espécie de planta ideal para cada caso também é um fator importante para a eficiência da fitorremediação. A espécie escolhida deve ser tolerante ao contaminante em questão, estar apta a sobreviver nas condições climáticas locais, não oferecer riscos à biodiversidade local, apresentar altas taxas de crescimento e produção de biomassa, além da alta capacidade de bioacumulação (Nakbanpote et al., 2016; Said et al., 2019).

Porém, é muito difícil encontrar uma espécie que reúna todas essas características. Algumas plantas apresentam alta capacidade de acumular metais em seus tecidos, no entanto, possuem crescimento lento e baixa produção de biomassa. Outras espécies têm o perfil oposto, apresentam baixa capacidade de bioacumulação, porém com altas taxas de crescimento (Jing et al., 2007).

2.7 A MACRÓFITA AQUÁTICA *Lemna minor*

As plantas que habitam os ecossistemas aquáticos são conhecidas vulgarmente como macrófitas aquáticas e podem ser divididas em: submersas, flutuantes e emergentes. As macrófitas apresentam grande potencial para fitorremediação de ecossistemas aquáticos, pois podem absorver os contaminantes solúveis e

biodisponíveis na água (Nakbanpote et al., 2016). As macrófitas submersas podem absorver e acumular metais por todo o corpo, enquanto as flutuantes absorvem e acumulam principalmente nas raízes (Rahman e Hasegawa, 2011).

Várias espécies de macrófita já demonstraram potencial para fitorremediação de metais, como *Eichhornia crassipes* (aguapé), *Lemna* spp. (lentilha d'água), *Spirodela polyrhiza* (lentilha d'água), *Azolla* spp. (samambaia d'água/musgo d'água), *Salvinia* spp. (marrequinha/salvínia), *Pistia stratiotes* (alface d'água), *Elodea* spp. (elódia), e *Typha* spp. (taboa) (Nakbanpote et al., 2016).

Dentre as espécies e gêneros citados, as lentilhas d'água (*Lemna* spp. e *Spirodela polyrhiza*) vêm chamando atenção, sendo utilizadas em muitos estudos de fitorremediação (Mkandawire e Dudel, 2005; Rahman et al., 2007; Kellaf e Zerdaoui, 2009; Appenroth et al., 2010; Bharti e Banerjee, 2012; Parnian et al., 2016). A sua popularidade ocorre devido à sua ampla distribuição, de modo que se pode facilmente encontrá-las em lagos, córregos e até mesmo efluentes (Nakbanpote et al., 2016).

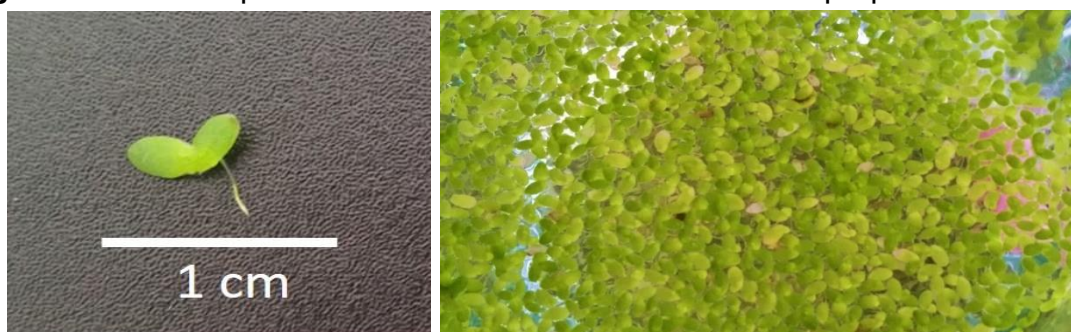
As espécies dos gêneros *Lemna* e *Spirodela* são angiospermas monocotiledôneas que pertencem à ordem Alismatales, família Lemnaceae (APG IV, 2016; Sree et al., 2016). São pequenas plantas flutuantes que não apresentam caule ou folhas distintas, de modo que todo o seu corpo é reduzido a uma estrutura pequena e plana, conhecida como fronde (Rahman e Hasegawa, 2011). Na maior parte do tempo, se reproduzem apenas de forma vegetativa (Landolt, 1998). Além do gênero *Lemna* e *Spirodela*, a família Lemnaceae possui outros 3 gêneros: *Landoltia*, *Wolffia* e *Wolffiella* (Sree et al., 2016).

O gênero *Lemna* é constituído por 13 espécies, que apresentam ampla distribuição, principalmente na Ásia, América do Norte e América do Sul. No Brasil podem ser encontradas 4 espécies deste gênero: *Lemna aequinoctialis*, *Lemna gibba*, *Lemna minuta* e *Lemna valdiviana* (Pott, 2020).

A espécie *Lemna minor* L. (1753) (Fig. 2.7), não ocorre naturalmente no Brasil (Coelho et al., 2015), mas é amplamente encontrada no setor de aquarismo, sendo utilizada como planta ornamental. Esta espécie foi escolhida para o processo de fitorremediação deste trabalho por já apresentar eficiência na remoção de metais e compostos orgânicos (Khataee et al., 2012; Vaseem e Banerjee, 2012; Uysal, 2013; Panfili et al., 2017), por ser facilmente adquirida comercialmente e amplamente distribuída no globo. Além disso, plantas invasoras podem ser melhores candidatas para fitorremediação, pois muitas plantas nativas não sobrevivem a altas

concentrações de poluentes (Prabakaran et al., 2019).

Figura 2.10 - Exemplos adultos de *Lemna minor*. Fonte: a própria autora.



2.8 O PEIXE *Prochilodus lineatus* COMO MODELO EXPERIMENTAL

Os peixes representam um grupo de vertebrados com enorme biodiversidade, apresentando aproximadamente 28 mil espécies, cerca de 50% de todas as espécies de vertebrados. Devido à esta diversidade, os peixes são muito utilizados para avaliação da qualidade ambiental dos mais variados tipos de ecossistemas (López-López e Sedeño-Díaz, 2015).

Outras características desse grupo também contribuem para sua ampla utilização em estudos de toxicidade aquática. Os peixes estão durante toda a sua vida em contato direto com a água e com os compostos presentes nesse meio, sendo expostos a possíveis efeitos tóxicos. Apresentam grande diversidade de hábitos alimentares, o que permite a avaliação do efeito de contaminantes sobre diversos nichos ecológicos (Embry et al., 2010; López-López e Sedeño-Díaz, 2015).

Muitas espécies de peixe são convenientes tanto para estudos em campo quanto laboratório, permitindo a comparação entre as respostas biológicas em ambiente controlado e no ambiente natural. Além disso, a taxonomia e a fisiologia desse grupo já são bem estabelecidas em comparação a outros grupos (Embry et al., 2010; López-López e Sedeño-Díaz, 2015).

Nesse sentido, o peixe *P. lineatus* (Fig. 2.8) foi escolhido como modelo experimental deste trabalho. *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é um teleósteo neotropical, da ordem Characiformes, família Prochilodontidae, popularmente conhecido como curimba ou curimatá (Castro e Vari, 2004).

Esta espécie é de grande relevância ecológica para ictiofauna brasileira, sendo amplamente distribuída no sul da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Além disso,

P. lineatus já mostrou ser adequado para estudos ecotoxicológicos, pois se adapta facilmente às condições de laboratório e é sensível à diversos metais, como alumínio (Camargo et al., 2009; Galindo et al., 2010), cobre (Simonato et al., 2016), cádmio (da Silva e Martinez, 2014), chumbo (Ribeiro et al., 2014) e níquel (Palermo et al., 2015).

Figura 2.11 - Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Fonte: a própria autora.



2.9 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.9.1 Objetivo Geral

Avaliar se os efeitos subletais observados em *P. lineatus* devido à sua exposição aos metais Cd e Ni, isolados ou em mistura, são atenuados na presença da macrófita aquática *L. minor*.

2.9.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se a presença da *L. minor* na superfície dos meios de exposição promove a redução da concentração de metalotioneínas e do acúmulo de Cd e Ni em *P. lineatus* expostos aos metais Cd e Ni.
- Verificar se os parâmetros genotóxicos e neurotóxicos, de *P. lineatus* expostos ao Cd e Ni, com a presença da *L. minor* nos meios de exposição, ficam mais próximos aos encontrados nos animais do grupo controle;
- Investigar se na presença da *L. minor*, alterações hematológicas e osmo-iônicas, assim como danos morfológicos nas brânquias, são evitados em *P. lineatus* devido a exposição aos metais Cd e Ni.

2.9.3 Hipótese

A macrófita aquática *L. minor* promove uma redução na concentração de metais nos meios de exposição, e essa redução deve minimizar ou impedir a bioacumulação de metais nos peixes. Conseqüentemente, *P. lineatus* expostos ao Cd e ao Ni, devem apresentar um estado de saúde mais próximo ao encontrado nos animais do grupo controle.

2.10 REFERÊNCIAS

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C. (Eds.). (2015). Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks. Academic press. 503 p.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Appenroth, K.J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W., Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78(3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>
- Araújo, C.R.M., Santos, V.D.A., Gonsalves, A.A. (2016). Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química* 8(6), 1818–1834. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- Asad, S.A., Farooq, M., Afzal, A., West, H. (2019). Integrated phytobial heavy metal remediation strategies for a sustainable clean environment - A review. *Chemosphere* 217, 925–941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.021>
- Atli, G., Canli, M. (2013). Metals (Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environmental Toxicology* 28(12), 707–717. <https://doi.org/10.1002/tox.20766>
- Au, D.W.T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48(9–10), 817–834. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.032>
- Barbee, N.C., Ganio, K., Swearer, S.E. (2014). Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. *Aquatic Toxicology* 152, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.012>
- Bharti, S., Banerjee, T.K. (2012). Phytoremediation of the coalmine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.009>
- Bjerregaard, P., Andersen, C.B.I., Andersen, O. (2015). Ecotoxicology of metals—sources, transport, and effects on the ecosystem. In: Nordberg, B.A., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds), *Handbook on the Toxicology of Metals*, v. I, General Considerations, 4th ed. Academic Press, pp. 425–459.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00021-4>
- Blewett, T.A., Wood, C.M., Glover, C.N. (2016). Salinity-dependent nickel accumulation and effects on respiration, ion regulation and oxidative stress in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*. *Environmental Pollution* 214, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.010>
- Bolognesi, C., Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26(1), 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Bradley, T.J. (2009). Hyper-regulators: life in fresh water. In: Bradley, T.J. (Ed), *Animal osmoregulation*. Oxford University Press, Oxford, pp. 86–110.
- Brasil, Conselho Nacional de Meio Ambiente (2008). Resolução, Conama n° 401, de 04/11/2008. Estabelece os limites máximos de chumbo, cádmio e mercúrio para pilhas e baterias comercializadas no território nacional e os critérios e padrões para o seu gerenciamento ambientalmente adequado, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 04 nov. 2008.
- Brix, K.V., Schlekot, C.E., Garman, E.R. (2017). The mechanisms of nickel toxicity in aquatic environments: An adverse outcome pathway analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(5), 1128–1137. <https://doi.org/10.1002/etc.3706>
- Camargo, M.M., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R. (2009). How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 94(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.017>
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S. (2012). Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.10.003>
- Carolin, C.F., Kumar, P.S., Saravanan, A., Joshiba, G.J., Naushad, M. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5(3), 2782–2799. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.029>
- Carrola, J., Santos, N., Rocha, M.J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal, M.A., Monteiro, R.A., Rocha, E. (2014). Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. *Environmental Science and Pollution Research* 21(9), 6057–6068. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2537-0>

- Castro, R.M.C., Vari, R.P. (Eds). (2004). Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. Smithsonian Contributions to Zoology, Washington. 189 p.
- Coelho, M.A.N., Soares, M.L., Calazans, L.S.B., Gonçalves, E.G., de Andrade, I.M., Pontes, T.A., Sakuragui, C.M., Temponi, L.G., Buturi, C., Mayo, S. (2015). Araceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33857>>.
- Couture, P., Pyle, G. (2011). Field studies on metal accumulation and effects in fish. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), Fish Physiology, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, pp 417–473. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31009-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31009-6)
- da Silva, A.O., Martinez, C.B.R. (2014). Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. Aquatic Toxicology 156, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.009>
- Davidson, T., Ke, Q., Costa, M. (2015). Selected molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenicity. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.), Handbook on the Toxicology of Metals, v. I, General Considerations, 4th ed. Academic Press, pp. 173–196. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00009-3>
- de Oliveira, C.R., Bernardes, A.M., Gerbase, A.E. (2012). Collection and recycling of electronic scrap: A worldwide overview and comparison with the Brazilian situation. Waste management 32(8), 1592–1610. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.003>
- Depledge, M.H. (1993). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M.C. Fossi, C. Leonzio (Eds), Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 261–285.
- Dew, W.A., Veldhoen, N., Carew, A.C., Helbing, C.C., Pyle, G.G. (2016). Cadmium-induced olfactory dysfunction in rainbow trout: Effects of binary and quaternary metal mixtures. Aquatic Toxicology 172, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.018>
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. Aquatic Toxicology 97(2), 79–87.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>

- Eurostat, European Statistical Office. (2020). Waste statistics - recycling of batteries and accumulators. Disponível em: <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics_-_recycling_of_batteries_and_accumulators>. Acesso em: 31 maio. 2021.
- 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>
- Farag, M.R., Alagawany, M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 279, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>
- Galindo, B.A., Troilo, G., Cólus, I.M.S., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. (2010). Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water, Air, & Soil Pollution* 212(1–4), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0357-5>
- Ghosh, M., Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal on Energy and Environment* 6(4), 214–231.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology* 212(11), 1647–1661. <https://doi.org/10.1242/jeb.029181>
- Harter, T.S., Brauner, C.J. (2017). The O₂ and CO₂ Transport System in Teleosts and the Specialized Mechanisms that Enhance Hb–O₂ Unloading to Tissues. In: Gamperl, A.K., Gillis, T.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish physiology*, v. 36 B, *The Cardiovascular System: Development, Plasticity and Physiological Responses*. Academic Press, pp. 1–106. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.09.001>
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (2012). *Animal Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hwang, P.P. (2011). Mechanisms of Ion Transport in Freshwater Fishes. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, *Gas Exchange, Internal Homeostatis, and Food Uptake*. Academic Press, pp. 1359–1365.
- Iqbal, N., Hayat, M.T., Zeb, B.S., Abbas, Z., Ahmed, T. (2019). Phytoremediation of Cd-Contaminated Soil and Water. In: Hasanuzzaman, M., Prasad, M.N.V., Fujita,

- M. (Eds.), Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation. Academic Press, pp. 531–543. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00021-8>
- Jeevanantham, S., Saravanan, A., Hemavathy, R.V., Kumar, P.S., Yaashikaa, P.R., Yuvaraj, 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>
- Jing, Y., He, Z., Yang, X. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8(3), 192–207. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>
- Kennedy, C.J. (2011). The Toxicology of Metals in Fishes. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 3, Energetics, Interactions with the Environment, Lifestyles, and Applications. Academic Press, pp. 2061–2068.
- Khataee, A.R., Movafeghi, A., Torbati, S., Lisar, S.S., Zarei, M. (2012). Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor* L.) in degradation of CI Acid Blue 92: Artificial neural network modeling. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.021>
- Khellaf, N., Zerdaoui, M. (2009). Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource technology* 100(23), 6137–6140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.043>
- Klein, C., Costa, M. (2015). Nickel. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, v. II, Specific Metals, 4th ed. Academic Press, pp. 1091–1111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00048-2>
- Komjarova, I., Blust, R. (2009). Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* 43(19), 7225–7229. <https://doi.org/10.1021/es900587r>
- Kubrak, O.I., Rovenko, B.M., Husak, V.V., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2012). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish *Carassius auratus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.006>
- Landolt, E. (1998). Lemnaceae. In: Kubitzki, K. (Ed), *The Families and Genera of*

- Vascular Plants, v. IV, Flowering Plants Monocotyledons Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer, Berlin, pp. 264–270.
- Le Croizier, G., Lacroix, C., Artigaud, S., Le Floch, S., Raffray, J., Penicaud, V., Coquillé, V., Autier, J., Rouget, M.L., Le Bayon, N., Laë, R., De Morais, L.T. (2018). Significance of metallothioneins in differential cadmium accumulation kinetics between two marine fish species. *Environmental Pollution* 236, 462–476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.002>
- López-López, E., Sedeño-Díaz, J.E. (2015). Biological Indicators of Water Quality: The Role of Fish and Macroinvertebrates. In: Armon, R.H., Hänninen, O. (Eds), *Environmental Indicators*. Springer, Dordrecht, pp. 643–661. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9499-2_37
- Marshall, W.S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293(3), 264–283. <https://doi.org/10.1002/jez.10127>
- McGeer, J.C., Niyogi, S., Smith, D.S. (2011). Cadmium. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 B, Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Academic Press, pp 125–184. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31025-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31025-4)
- Mkandawire, M., Dudel, E.G. (2005). Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L.(duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment* 336(1–3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.06.002>
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R. (2011). *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 104(3–4), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.002>
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas Del Castillo, E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29(1), 117–140.
- Nakbanpote, W., Meesungnoen, O., Prasad, M.N.V. (2016). Potential of ornamental plants for phytoremediation of heavy metals and income generation. In: Prasad, M.N.V. (Ed), *Bioremediation and Bioeconomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802830-8.00009-5>

- Nikinmaa, M. (2014). *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Academic Press, Oxford. 240 p.
- Nilsson, G.E. (2011). Plasticity in Gill Morphology. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 796–802.
- Niyogi, S., Nadella, S.R., Wood, C.M. (2015). Interactive effects of waterborne metals in binary mixtures on short-term gill–metal binding and ion uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 165, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.016>
- Nunes, B. (2011). The use of cholinesterases in ecotoxicology. In: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 212. Springer, New York, pp. 29–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8453-1_2
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R. (2015). Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 116, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>
- Pane, E.F., Richards, J.G., Wood, C. M. (2003). Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquatic Toxicology* 63(1), 65–82. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00131-5)
- Panfili, I., Bartucca, M.L., Ballerini, E., Del Buono, 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>
- Parnian, A., Chorom, M., Jaafarzadeh, N., Dinarvand, M. (2016). Use of two aquatic macrophytes for the removal of heavy metals from synthetic medium. *Ecotoxicology & Hydrobiology* 16(3), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2016.07.001>
- Pereira, L.S., Ribas, J.L.C., Vicari, T., Silva, S.B., Stival, J., Baldan, A.P., Domingos, F.X.V., Grassi, M.T., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C. (2016). Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.046>
- Pereira, B.V., Silva-Zacarin, E.C., Costa, M.J., Dos Santos, A.C.A., do Carmo, J.B., Nunes, B. (2019). Cholinesterases characterization of three tropical fish species,

- and their sensitivity towards specific contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 173, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.105>
- Pérez, E., Hoang, T.C. (2018). Responses of *Daphnia magna* to chronic exposure of cadmium and nickel mixtures. *Chemosphere* 208, 991–1001. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.063>
- Pott, V.J. (2020). *Lemna* in Flora do Brasil 2020 em construção, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5003>>. Acesso em: 26 Fev. 2020.
- Prabakaran, K., Li, J., Anandkumar, A., Leng, Z., Zou, C.B., Du, D. (2019). Managing environmental contamination through phytoremediation by invasive plants: A review. *Ecological Engineering* 138, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.07.002>
- Pyle, G., Couture, P. (2011). Nickel. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, pp 253–289. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31005-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31005-9)
- Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Okumura, C., Rahman, M.M. (2007). Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): a good option for phytoremediation. *Chemosphere* 69(3), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.019>
- Rahman, M.A., Hasegawa, H. (2011). Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* 83(5), 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.045>
- Reid, S.G. (2011). Catecholamines. In: Farrell, A.P. (Ed) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 1524–1533.
- Ribeiro, A.M., Risso, W.E., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R. (2014). Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40(3), 645–657. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9873-8>
- Rocha, R.S. (2016). Avaliação da genotoxicidade de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Said, O.B., da Silva, M.M., Hannier, F., Beyrem, H., Chícharo, L. (2019). Using

- Sarcocornia fruticosa* and *Saccharomyces cerevisiae* to remediate metal contaminated sediments of the Ria Formosa lagoon (SE Portugal). *Ecohydrology & Hydrobiology* 19(4), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2018.10.002>
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert S., Depledge, M., Benson, W. (2008). Biomarkers. In: Di Giulio, R.T., Hinton D.E. (Eds), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 683–715.
- Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds). (2016). *Fish Physiology*, v. 35, *Biology of Stress in Fish*. Academic Press. 590 p.
- Seriani, R., Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, Â.T., Napoleão, S.R. (2011). Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33(1), 107–112. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v33i1.7117>
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of Cell Biology* 140(6), 1307–1320. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1307>
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A., Carvalho, P.S.M., Melletti, P.C., Assis, H.C.S, Bianchini, A., Martinez, C.B.R. (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>
- Sree, K.S., Bog, M., Appenroth, K.J. (2016). Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28(5), 291–302. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-038>
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., Halıcı, M.B., Şişecioglu, M., Erol, H.S., Gergit, A. Yılmaz, B. (2015). Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiology and Biochemistry* 41(3), 625–634. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0033-1>
- 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>
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79(2), 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>

- Uysal, Y. (2013). Removal of chromium ions from wastewater by duckweed, *Lemna minor* L. by using a pilot system with continuous flow. *Journal of Hazardous Materials* 263, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.006>
- Vardhan, K.H., Kumar, P.S., Panda, R.C. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids* 290, 111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>
- Vaseem, H., Banerjee, T.K. (2012). Phytoremediation of the toxic effluent generated during recovery of precious metals from polymetallic sea nodules. *International Journal of Phytoremediation* 14(5), 457–466. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.604695>
- Verbost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1988). Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *The Journal of Membrane Biology* 102(2), 97–104. <https://doi.org/10.1007/BF01870448>
- Vieceli, N., Margarido, F., Durão, F., Guimarães, C., Nogueira, C.A. (2015). Collection of waste batteries in Portugal and Brazil. In: Vilarinho, C., Castro, F., Russo, M. (Eds.), *WASTES – Solutions, Treatments and Opportunities: Selected Papers from the 3rd edition of the International Conference on Wastes: Solutions, Treatments and Opportunities*, Porto, Portugal. CRC press, pp 349–354.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 36(11), 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>
- Wegner, N.C. (2011). Gill Respiratory Morphometrics. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 803–811.
- Wendelaar Bonga, S.E. (2011). Hormone Response to Stress. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 1515–1523.
- Witeska, M. (2015). Anemia in teleost fishes. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 35(4), 148–160.
- Wood, C.M. (2011). An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, pp. 1–51. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31001-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31001-1)

Zheng, G.H., Liu, C.M., Sun, J.M., Feng, Z.J., Cheng, C. (2014). Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquatic Toxicology* 147, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.015>

3. CAPÍTULO 1: Manuscrito

A fitorremediação mediada por *Lemna minor* pode atenuar os efeitos subletais do cádmio e do níquel em um teleósteo neotropical?

Vanessa Bezerra, Wagner Ezequiel Risso, Juliana Delatim Simonato

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Aquatic Toxicology*.

3.1 RESUMO

A fitorremediação mediada pela macrófita aquática *Lemna minor* se mostra como uma possível alternativa para o tratamento de ecossistemas aquáticos contaminados por metais, como o cádmio (Cd) e o níquel (Ni). Desse modo, é de suma importância avaliar se esse tipo de tratamento pode atenuar os efeitos subletais provocados em organismos aquáticos, como os peixes, devido à exposição a metais. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar se a macrófita aquática *L. minor* atenua os efeitos subletais observados no peixe *Prochilodus lineatus* devido a exposição aos metais Cd e Ni, isolados ou em mistura. Para isso, foram realizadas exposições de 96 h ao Cd na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, ao Ni na concentração de $1,5 \text{mg L}^{-1}$, e a mistura destes dois metais, na presença ou ausência de *L. minor*. Ao final de todas as exposições foram coletadas amostras de diversos tecidos de *P. lineatus* para comparar entre os diferentes grupos de exposição o acúmulo de Cd e Ni, bem como as respostas de biomarcadores de genotoxicidade e neurotoxicidade, a concentração de metalotioneínas, a presença de danos histológicos nas brânquias, além de alterações hematológicas e osmo-iônicas. Como resultado, a exposição ao Cd isolado na ausência de *L. minor* provocou bioacumulação em vários tecidos, efeitos neurotóxicos, redução na atividade de enzimas de transporte iônico na brânquia, além de desbalanços iônicos. A exposição ao Ni na ausência das macrófitas também provocou bioacumulação e desbalanços iônicos, bem como a indução de metalotioneínas, um aumento do índice de alterações histológicas nas brânquias e o aumento da frequência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs). A exposição a mistura de metais na ausência de *L. minor* causou todos os efeitos subletais observados nas exposições aos metais isolados, além de um aumento na glicemia. A macrófita *L. minor* teve participação na redução da concentração de metais nos meios de exposição, acumulando Cd e Ni em seus tecidos. Desse modo, a fitorremediação pôde evitar o acúmulo de metais em alguns tecidos de *P. lineatus*, a hiperglicemia, além de alterações na atividade da acetilcolinesterase e na frequência de AENs. Entretanto, danos histológicos nas brânquias, alterações osmo-iônicas e a bioacumulação, principalmente nas brânquias, não foram atenuados pela fitorremediação. Desse modo, conclui-se que a fitorremediação de 96 h mediada pela macrófita aquática *L. minor* atenuou parcialmente os efeitos subletais provocados em *P. lineatus* devido à exposição aos metais Cd e Ni.

Palavras-chave: Bioacumulação de metais. Biomarcadores. Histologia. Neurotoxicidade. Osmorregulação.

3.2 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental é um problema de grande preocupação atualmente. Atividades antrópicas como urbanização, mineração e produção industrial, provocam a contaminação do solo e da água, fragilizando ainda mais habitats já fragmentados (Iqbal et al., 2019). Nesse contexto, os metais se destacam como contaminantes no ambiente aquático, pois podem ser tóxicos em baixas concentrações, além de serem persistentes no ambiente e facilmente transferidos pela cadeia alimentar (Nakbanpote et al., 2016).

Neste estudo destacamos a importância do cádmio (Cd) e do níquel (Ni) como contaminantes ambientais. O Cd é muito utilizado na indústria em processos como galvanização e produção de pigmentos e ligas metálicas, além de ser comumente encontrado como resíduo de fertilizantes agrícolas fosfatados (Nikinmaa, 2014; Carolin et al., 2017). O Ni é amplamente utilizado na indústria para galvanoplastia e produção de ligas metálicas, sendo também muito usado na produção de itens cotidianos como eletrônicos, moedas, bijuterias, relógios e armação de óculos (Klein e Costa, 2015).

A extensa contaminação por Cd e Ni (bem como outros metais) em diversos ecossistemas aquáticos resultou numa grande quantidade de estudos sobre os efeitos tóxicos desses contaminantes em peixes (Couture e Pyle, 2011). Sabe-se que exposições ao Cd ou ao Ni podem provocar danos morfológicos nas brânquias, alterações no transporte iônico (da Silva e Martinez 2014; Bjerregaard et al., 2015; Brix et al., 2017; Topal et al., 2017) e acúmulo de metal em diversos tecidos de peixes (Cao et al., 2012; Palermo et al., 2015). Além disso, esses metais já demonstraram potencial genotóxico (Palermo et al., 2015; Pereira et al., 2016), neurotóxico (Topal et al., 2015; Naija et al., 2017), e provocaram vários outros efeitos subletais em peixes, como alterações no metabolismo energético (Pyle e Couture, 2011; Chen et al., 2019), alterações hematológicas (Pane et al., 2003; Pereira et al., 2016) e aumento na concentração de metalotioneínas, proteínas importantes para a regulação da concentração de metais nos organismos (Vincent et al., 2019; Palermo et al., 2015).

O Cd e o Ni também são muito utilizados em conjunto para fabricação de baterias (Carolin et al., 2017), podendo contaminar o meio ambiente simultaneamente devido ao descarte incorreto desses produtos em aterros sanitários (Conte, 2016). No entanto, ainda não se sabe exatamente quais os efeitos da mistura de Cd e Ni em

peixes. Alguns autores não observaram interação entre estes dois metais após exposições agudas (Niyogi et al., 2015), enquanto outros discutem a ocorrência de efeitos protetivos do Ni sobre o Cd (Drew et al., 2016).

Contudo, diversas tecnologias já foram desenvolvidas para a remoção de metais, como o Cd e o Ni, de efluentes e águas residuais. Pode-se citar como exemplos o tratamento eletroquímico, a flotação, a filtração por membranas, a precipitação química e a permuta iônica. Porém, a maior parte desses tratamentos são muito caros e/ou geram resíduos (Carolin et al., 2017). Nesse contexto, a fitorremediação se mostra como uma alternativa de grande interesse.

Segundo Iqbal et al. (2019), a fitorremediação pode ser definida como um tipo de biorremediação, no qual plantas são utilizadas para degradar ou imobilizar contaminantes do solo ou da água, reduzindo assim seus efeitos tóxicos. Esta técnica exige um tempo maior para a remoção dos contaminantes (no mínimo alguns dias) porém já se mostrou como um tratamento eficaz, seguro e barato (Asad et al., 2019; Jeevanantham et al., 2019).

Diversas macrófitas aquáticas já demonstraram potencial para fitorremediação de metais, no entanto, plantas do gênero *Lemna*, popularmente conhecidas como lentilha d'água, vêm chamando maior atenção. Esse gênero é muito empregado em trabalhos de toxicidade em plantas e em estudos de fitoextração de metais (Vaseem e Banerjee, 2012; Uysal, 2013; Panfili et al., 2017), devido a sua vasta distribuição em ambientes aquáticos (Nakbanpote et al., 2016).

Entretanto, poucos estudos demonstram se a fitorremediação mediada por macrófitas aquáticas atenua os efeitos subletais provocados por contaminantes em organismos aquáticos (Bharti e Banerjee, 2013; Vaseem e Banerjee 2015; Goswami e Das, 2018). De modo que, dentro do nosso conhecimento, nenhum trabalho avaliou o sucesso da fitorremediação, mediada por macrófitas aquáticas, em atenuar os efeitos subletais provocados pelo Cd e Ni em peixes.

O teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* foi escolhido como modelo experimental por tratar-se de uma espécie de grande relevância ecológica para ictiofauna brasileira e amplamente distribuída na região sul da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Este peixe é popularmente conhecido como curimba ou curimbatá e já se mostrou adequado para avaliações ecotoxicológicas, devido à sua fácil adaptação às condições de laboratório e à sua sensibilidade a diversos metais, como cobre (Simonato et al., 2016), cádmio (da Silva e Martinez, 2014) e níquel (Palermo et al.,

2015).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar se a macrófita aquática *L. minor* pode atenuar os efeitos subletais observados em *P. lineatus* devido a exposição aos metais Cd e Ni, isolados ou em mistura.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais Experimentais

Exemplares juvenis de *P. lineatus* ($n = 96$; $24,8 \pm 1,1$ g; $13,9 \pm 0,2$ cm; média \pm EP) foram adquiridos comercialmente em uma piscicultura local. No laboratório, os animais foram aclimatados por no mínimo 7 dias, em tanques de 500 L contendo água livre de cloro, sob aeração constante, fotoperíodo 12:12 h claro/escuro, com renovação da água e alimentação com ração comercial (Guabi, Brasil) a cada 48 h. Os parâmetros químicos e físicos da água foram monitorados durante toda a aclimação com um analisador de multiparâmetros (HORIBA U52) e se mantiveram adequados (temperatura: $22,96 \pm 0,12$ °C; pH: $6,83 \pm 0,13$; oxigênio dissolvido: $5,82 \pm 0,08$ mg L⁻¹; condutividade: $141,2 \pm 5,5$ µS/cm; turbidez: $5,20 \pm 1,49$ NTU; média \pm EP). Todos os procedimentos realizados com os animais neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 13642.2019.46).

3.3.2 Macrófitas Aquáticas

Exemplares de *Lemna minor* foram adquiridos comercialmente e cultivados em caixas plásticas de 10 L em solução de Steinberg (OECD, 2006), com modificações (KCl 4,69 mM; CaCl₂ 2,01 mM; KH₂PO₄ 0,66 mM; K₂HPO₄ 0,07 mM; MgSO₄ 0,41 mM; H₃BO₃ 1,94 µM; ZnSO₄ 0,63 µM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0,04 µM; MnCl₂ 0,91µM; FeCl₃ 2,81 µM; EDTA dissódico 4,03 µM; pH 5,5). Estas caixas de cultivo foram mantidas em incubadora (25°C; fotoperíodo 12:12h claro/escuro), com renovação do meio a cada 7 dias.

Antes dos experimentos, as macrófita foram aclimatadas por no mínimo 7 dias em água desclorada. Após a aclimação, uma área de aproximadamente 2/3 da superfície dos aquários dos grupos experimentais especificados a seguir (seção 3.3.4) foi recoberta com exemplares de *L. minor*. Todos os aquários possuíam as seguintes dimensões: 50 x 30 x 35 cm (comprimento x largura x altura). As macrófitas formavam

uma camada única sobre a superfície da água, de modo que não havia sobreposição entre as plantas. A quantidade de plantas adicionadas a cada aquário apresentava um peso úmido de $26,1 \pm 7,9$ g e peso seco de $0,6 \pm 0,2$ g (média \pm DP).

3.3.3 Preparação dos Meios de Exposição

Para preparação dos meios de exposição, o Cd foi utilizado na forma de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o Ni na forma de cloreto de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Previamente aos experimentos de exposição foram preparadas soluções estoque na concentração de 5 g L^{-1} de Cd e 40 g L^{-1} de Ni. Uma alíquota dessas soluções estoque foi utilizada para atingir a concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni nos meios de exposição. Estas concentrações foram escolhidas por serem valores próximos às concentrações de Cd e Ni que provocaram efeitos subletais em *P. lineatus* nos trabalhos de da Silva e Martinez (2014) e Palermo et al. (2015).

3.3.4 Delineamento Experimental e Amostragem

Após a aclimação, foram realizados três experimentos de exposição. Em cada experimento, 32 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 8 indivíduos cada. Cada grupo foi subdividido em 2 aquários de vidro de 40 L cada, e foram expostos simultaneamente por um período de 96 h, sem renovação dos meios de exposição e com fotoperíodo 12:12 h claro/escuro. Os parâmetros químicos e físicos da água, citados anteriormente, foram monitorados durante as exposições com um analisador de multiparâmetros (HORIBA U52). Além disso, amostras de água de todos os aquários também foram coletadas para determinação da dureza pelo método titrimétrico do EDTA.

Em todas as exposições, havia um grupo controle (CTR), no qual os peixes foram expostos apenas à água desclorada, e um grupo fitorremediação controle (Fito CTR), no qual os animais foram expostos à água desclorada e à presença de exemplares de *L. minor* sobre a água.

No primeiro experimento de exposição, dois grupos de peixes foram expostos ao Cd na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo um grupo com a presença de *L. minor* na superfície da água (grupo Fito Cd) e o outro grupo com a ausência das plantas (grupo Cd). No segundo experimento de exposição, dois grupos de peixes foram expostos ao Ni na concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, de modo que em um grupo haviam exemplares de *L. minor* na superfície da água (grupo Fito Ni) e no outro grupo não haviam plantas

(grupo Ni). No terceiro experimento de exposição, dois grupos de peixes foram expostos à mistura de Cd e Ni, nas concentrações de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Um destes dois grupos contava com a presença de exemplares de *L. minor* na superfície da água (grupo Fito Mix) e o outro grupo não (grupo Mix).

Ao final do período de exposição de cada experimento, após serem retirados dos aquários, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), para coleta de sangue pela veia caudal. Uma alíquota de sangue foi utilizada para avaliação de danos genotóxicos, e o restante foi usado para a determinação dos parâmetros hematológicos. Depois da coleta de sangue, os animais foram mortos por secção medular, para a retirada de brânquias, fígado, rim posterior, cérebro e músculo. As amostras destes tecidos foram mantidas congeladas a -70°C , até o momento das análises, com exceção de um arco branquial, que foi imediatamente fixado após a remoção para análises histopatológicas. Ao final da amostragem, após a realização das análises hematológicas, o restante do sangue foi centrifugado (1870 g ; 10 min) para obtenção do plasma, que foi congelado a -20°C até o momento das análises.

3.3.5 Bioacumulação e Concentração de Metais nos Meios de Exposição

Duas amostras de água de todos os aquários foram coletadas no tempo 0 h e depois a cada 24 h durante o período de exposição, para análise da concentração de Cd e/ou Ni. Uma amostra foi filtrada (malha de $0,45 \mu\text{m}$, Millipore Millex HV/PVDF) antes da acidificação ($1\% \text{ HNO}_3$) para a análise da concentração de metal dissolvido e outra amostra foi somente acidificada para determinação da concentração de metal total.

Para a análise de acúmulo de Cd e Ni nos tecidos dos peixes, amostras coletadas de brânquia, fígado, rim, cérebro e músculo foram armazenadas em tubos plásticos previamente descontaminados. Posteriormente, os tecidos foram colocados em estufa a 60°C , até a sua secagem completa. Em seguida, os tecidos foram pesados e submetidos à digestão em ácido nítrico 5 N, em estufa a 60°C por 48 h (Alves e Wood, 2006).

Exemplares de *L. minor* também foram avaliados quanto ao acúmulo de Cd e Ni. Ao final da exposição, 8 amostras de aproximadamente $0,1 \text{ g}$ de lentilhas d'água (plantas inteiras) foram coletadas dos grupos que continham macrófitas, e em seguida foram lavadas em solução de EDTA dissódico (12 mM), para a remoção de metais adsorvidos (Costa et al., 2018). Em seguida, as amostras foram armazenadas em

tubos plásticos descontaminados e foram submetidas aos mesmos processos descritos acima para os tecidos de peixe, diferindo apenas no tempo de digestão na estufa, que neste caso foi de 96 h, de acordo com Costa et al. (2018).

As amostras de água e de tecido digerido foram então utilizadas para a determinação da concentração de Cd e Ni por atomização eletrotérmica em forno de grafite acoplado a um espectrofotômetro de absorção atômica (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA). Neste equipamento, o limite de detecção do Cd é $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e do Ni é $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.6 Biomarcador de Exposição a Metais

A concentração de metalotioneínas (MT) foi determinada em amostras de brânquia, fígado e músculo, pelo método espectrofotométrico descrito por Viarengo et al. (1997). Os tecidos foram homogeneizados individualmente (brânquia e músculo 1:2; fígado 1:3 m/v) em tampão (sacarose 0,5 M; Tris 26 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM; β -mercaptoetanol 1,3 mM) e centrifugados por 45 min (18000 g; 4°C). O sobrenadante foi ressuspenso em etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificadas. Nesta fração, os grupos sulfidril (-SH) foram quantificados em espectrofotômetro (Victor³™, PerkinElmer, USA) a 412 nm, considerando a glutathiona como padrão.

Para a padronização da expressão dos resultados, a concentração de proteínas das amostras de brânquias, fígado e músculo foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.3.7 Biomarcadores Hematológicos, Metabólicos e Osmo-Iônicos

Parte do sangue coletado na amostragem foi utilizado na determinação do hematócrito (Hcto), do número de eritrócitos (RBC) e da concentração de hemoglobina (Hb). Para o Hcto, uma alíquota de sangue foi depositada em microcapilares de vidro. Estes capilares foram centrifugados (1200 g, 7 min), para a separação das células e do plasma, e posteriormente, a porcentagem de eritrócitos foi definida com auxílio de um cartão padronizado. Para avaliação do número de eritrócitos, uma amostra de sangue foi diluída (1:200) em tampão formol citrato (citrato de sódio 130 mM em formaldeído 0,4%). Uma alíquota dessa mistura foi acondicionada em câmara de Neubauer, para a contagem de células em microscópio de luz, na objetiva de 40x. A concentração de Hb foi determinada em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, UK)

a 540 nm, através de método colorimétrico da cianometahemoglobina (*Kit* comercial Labtest Diagnóstica, Brasil).

No plasma, a concentração de glicose foi avaliada em espectrofotômetro (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA) a 505 nm, pelo método enzimático da glicose-oxidase (*Kit* comercial Doles Reagentes Ltda, Brasil). A concentração dos íons Na⁺ e K⁺ foi determinada em fotômetro de chama (DM-62, Digmed, Brazil), a partir de uma curva de calibração de solução padrão de ambos. A concentração Cl⁻ foi determinada por método colorimétrico (*Kit* comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA) a 470 nm, e a concentração de Ca²⁺ foi determinada por atomização por chama em espectrofotômetro de absorção atômica (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

Quanto ao tecido branquial, três arcos coletados de cada animal durante a amostragem foram armazenados em 1 mL de tampão SEI (sacarose 150 mM; EDTA 10 mM; imidazol 50 mM; pH 7,5) e posteriormente foram homogeneizados (1:5 m/v) em tampão SEI contendo adicionalmente 2,4 mM de deoxicolato de sódio. As amostras foram centrifugadas (20 min; 10000 g; 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação da atividade de enzimas envolvidas em trocas iônicas. As atividades da Na⁺/K⁺ ATPase (NKA) e da H⁺ ATPase (HATP) foram determinadas simultaneamente, pelo decaimento da absorbância do NADH a 340 nm (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA), de acordo com o método de Gibbs & Somero (1989), com modificações (McCormick, 1992). A atividade da Ca²⁺ ATPase (CaATP) foi avaliada de acordo com Vijayavel et al. (2007) com modificações, através da quantificação do Pi em espectrofotômetro (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm. Para determinação da atividade da anidrase carbônica (AC), uma alíquota de cada amostra foi adicionada a uma solução saturada de CO₂, sendo observado o decaimento do pH, de acordo com o método de Vitale et al. (1999). Para a padronização da expressão dos resultados destas enzimas de transporte iônico, a concentração de proteínas das amostras de brânquias foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.3.8 Biomarcador de Neurotoxicidade

Para avaliação de alterações neurotóxicas, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada em amostras de cérebro e músculo. Estas amostras foram diluídas (1:10 m/v), homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5) e centrifugadas (20 min; 15000 g; 4°C). O sobrenadante resultante foi

utilizado para determinar a atividade da AChE a partir da reação do iodeto de acetilcolina com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), em leitora de microplacas (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA) a 415 nm, de acordo com o método de Ellman et al. (1961), adaptado por Costa et al. (2007).

Além disso, a concentração de proteínas das amostras de cérebro e músculo foi determinada pelo método de Bradford (1976), para a padronização da expressão da atividade enzimática.

3.3.9 Biomarcadores de Genotoxicidade

A frequência de micronúcleos (MN) e de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) foi avaliada de acordo com Ueda et al. (1992), com algumas modificações. Durante a amostragem, 10 µL de sangue, por animal, foram utilizados na confecção de esfregaços sob duas lâminas de vidro limpas. As lâminas secaram à temperatura ambiente durante 24 h e, em seguida, foram fixadas com metanol durante 10 minutos. Para a análise, as lâminas foram coradas com laranja de acridina (0,003%) diluído em tampão de Sorenson (pH 6,8) e examinadas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x. Foram observados 3000 eritrócitos por peixe, sendo avaliadas a presença de MN e de alterações morfológicas no núcleo. Estas alterações foram classificadas como AENs, segundo Carrasco et al. (1990), e foram divididas nas seguintes categorias: núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em forma de rim e células binucleadas.

3.3.10 Biomarcadores Histopatológicos

Para avaliação de alterações histopatológicas, imediatamente após a coleta, um arco branquial foi fixado em solução Alfac (etanol 80% - 85 mL; formaldeído 40% - 10 mL; ácido acético glacial - 5 mL) durante 14 horas, e após este período em álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcóolica crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina para a identificação de alterações histopatológicas em microscopia de luz. As alterações encontradas foram avaliadas semi-quantitativamente através do Índice de Alterações Histológicas (IAH), segundo Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994) e Simonato et al. (2008).

Segundo este índice, a severidade das lesões observadas é classificada em graus progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais. O grau I se

refere a alterações que não comprometem o funcionamento do tecido; o grau II indica alterações graves que comprometem o funcionamento do órgão, mas são reversíveis; e o grau III designa as alterações severas que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão.

Um valor de IAH foi calculado para cada animal, de acordo com a fórmula: $IAH = (1 \cdot \sum I) + (10 \cdot \sum II) + (100 \cdot \sum III)$, de forma que I, II e III se referem ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido; entre 11 e 20 indicam danos leves ao órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados; de 50 a 99, danos severos e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

3.3.11 Análise Estatística

Para a análise estatística, cada experimento de exposição foi avaliado separadamente.

Em cada parâmetro avaliado em *P. lineatus*, os resultados foram comparados entre os grupos por meio de uma análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), de acordo com a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) dos dados. Em seguida, caso fosse indicada diferença estatística, foram realizados testes de comparações múltiplas (Student-Newman-Keuls ou Dunn), com nível de significância de 5%.

Na análise de acúmulo das amostras de *L. minor*, os resultados do grupo exposto apenas a água desclorada e do grupo exposto ao Cd e/ou ao Ni foram comparados por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. A normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) dos dados foram avaliados previamente, também sendo adotado um nível de significância de 5%.

Para padronização das tabelas e gráficos, todos os dados (paramétricos e não-paramétricos) foram expressos como média \pm erro padrão.

3.4 RESULTADOS

Os parâmetros químicos e físicos da água monitorados durante os experimentos se mantiveram constantes (média \pm EP; temperatura: $23,31 \pm 0,09$ °C; pH: $7,20 \pm 0,06$; oxigênio dissolvido: $7,06 \pm 0,06$ mg L⁻¹; condutividade: $115,6 \pm 2,6$ μ S/cm; turbidez: $0,75 \pm 0,38$ NTU; dureza: $30,76 \pm 0,46$ mg CaCO₃ L⁻¹).

Não houve mortalidade de peixes nos experimentos de exposição ao Cd e ao Ni isolados. Porém, no experimento de exposição à mistura dos metais houve mortalidade de 25% dos peixes no grupo Mix.

3.4.1 Concentração de Metais nos Meios de Exposição

Na exposição ao Cd, a concentração de metal dissolvido nos aquários do grupo Fito Cd apresentou uma variação percentual de -46%, e no grupo Cd a variação foi de -9,4% ao final da exposição (Fig. 3.1 A).

Na exposição ao Ni isolado, os aquários do grupo Fito Ni apresentaram uma variação percentual de -20% na concentração de metal dissolvido ao final período de exposição. Já no grupo Ni, a variação foi de -14% (Fig. 3.2 A).

Na exposição à mistura dos metais, a concentração Cd dissolvido teve uma variação percentual de -13% no grupo Fito Mix. No grupo Mix houve uma variação de -14% na concentração de Cd dissolvido (Fig. 3.1 B). Quanto a concentração de Ni, no grupo Fito Mix houve uma variação percentual foi de -15% na concentração de metal dissolvido. No grupo Mix a variação na concentração de Ni dissolvido foi de -14% (Fig. 3.2 B).

Em todos os experimentos, nos grupos CTR e Fito CTR as concentrações de Cd e/ou Ni estavam abaixo do limite de detecção. Mais detalhes sobre as concentrações efetivas de Cd e/ou Ni nos meios de exposição estão disponíveis no apêndice A.

3.4.2 Bioacumulação

Na exposição ao Cd isolado houve um aumento da concentração de Cd nas brânquias ($H = 21,86$; $p < 0,001$) e no fígado ($H = 21,45$; $p < 0,001$) dos animais do grupo Fito Cd e do grupo Cd. Também houve bioacumulação deste metal no rim ($F = 3,98$; $p = 0,022$) e no cérebro ($H = 8,91$; $p = 0,012$) dos peixes do grupo Cd (Fig. 3.3 A). No músculo não foi observada diferença estatística entre os grupos. Nas amostras de cérebro e músculo do grupo Fito CTR a concentração de Cd estava abaixo do limite de detecção.

Figura 3.1 – Concentração de cádmio em todos os aquários dos grupos Fito Cd e Cd, na exposição a este metal isolado (A); e nos grupos Fito Mix e Mix, na exposição à mistura de metais (B).

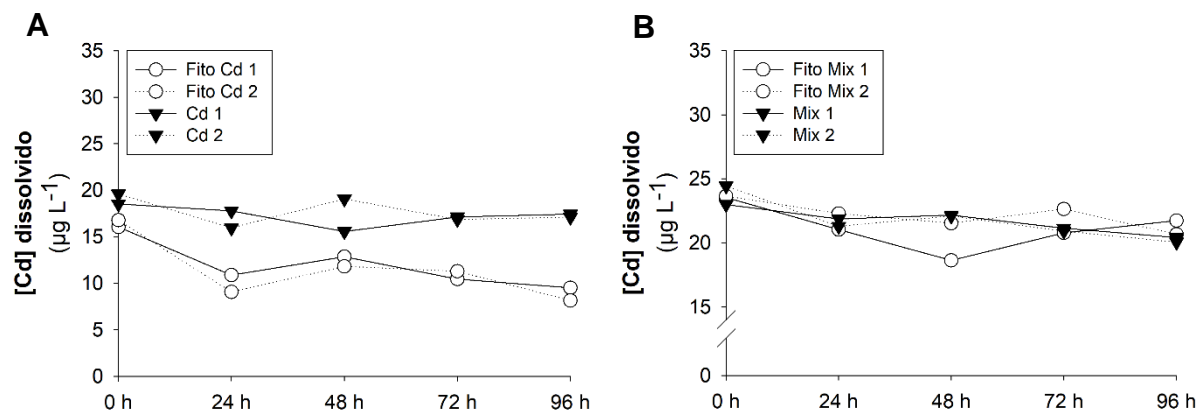
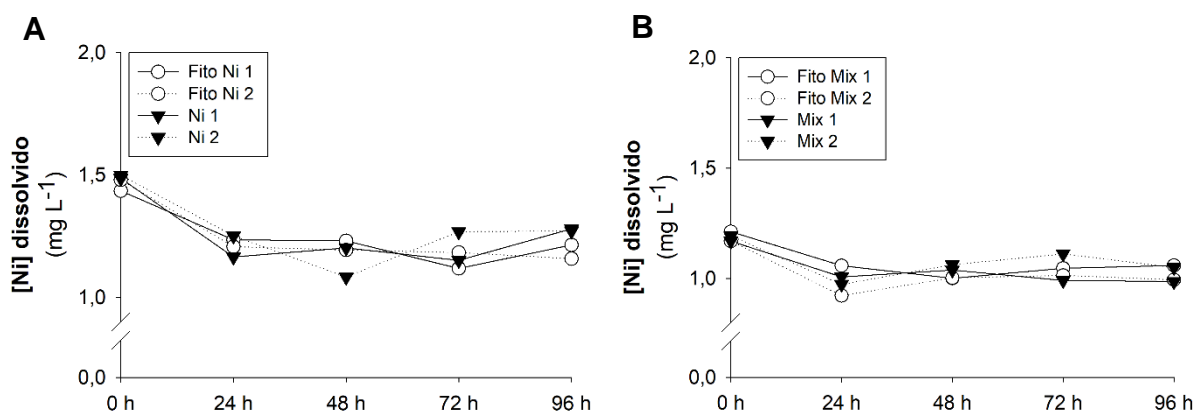


Figura 3.2 – Concentração de níquel em todos os aquários dos grupos Fito Ni e Ni, na exposição a este metal isolado (A); e nos grupos Fito Mix e Mix, na exposição à mistura de metais (B).



Quanto à macrófita *L. minor*, também foi observado aumento da concentração de Cd nas amostras do grupo Fito Cd ($U = 0,00$; $p < 0,001$) em relação ao grupo Fito CTR (Tab. 3.1).

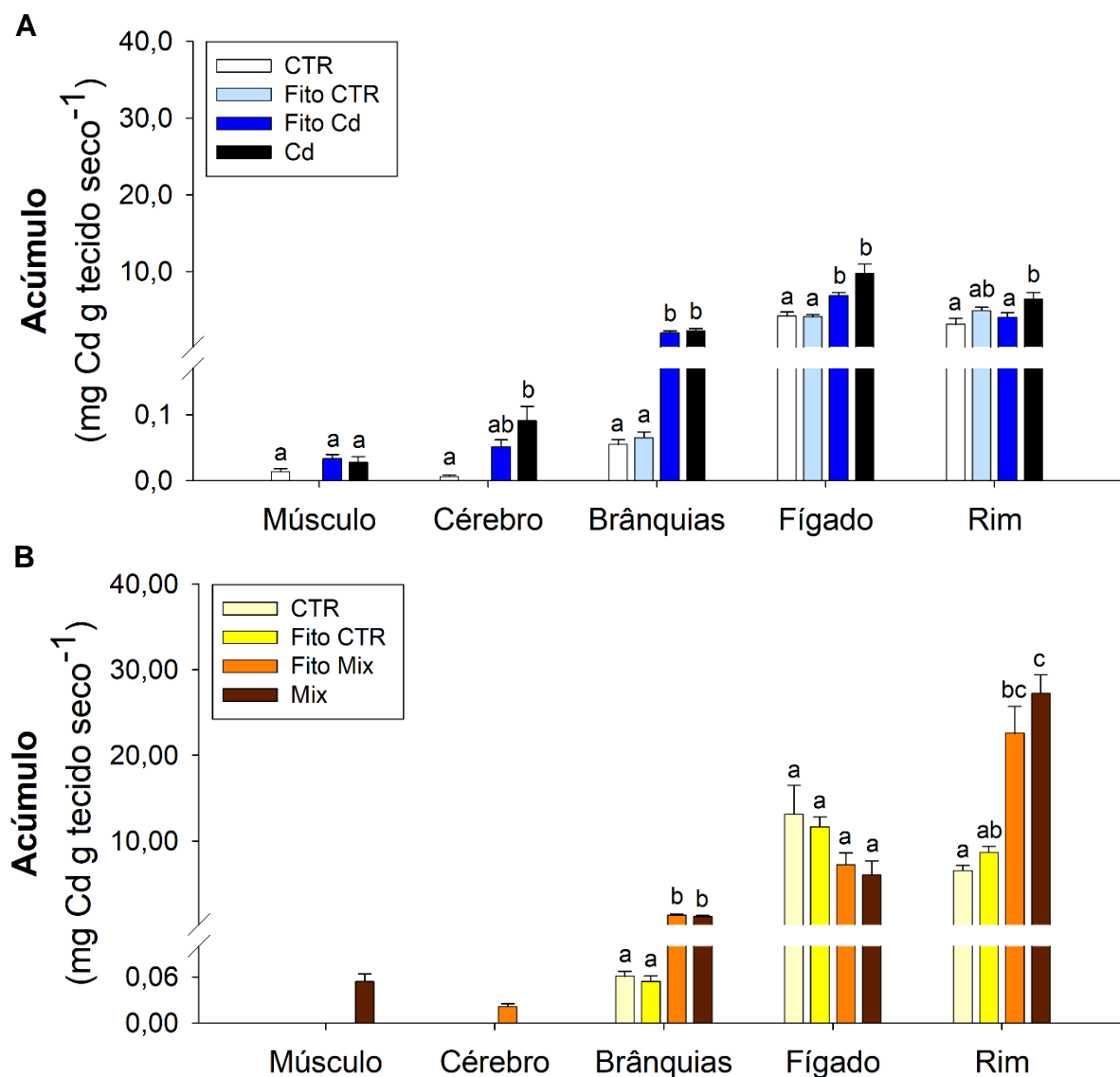
Na exposição a mistura, foi observado um aumento da concentração de Cd nas brânquias ($F = 68,49$; $p < 0,001$) e no rim ($H = 20,20$; $p < 0,001$) dos animais dos grupos Fito Mix e Mix (Fig. 3.3 B). No fígado não houve diferença significativa entre os grupos quanto a concentração de Cd. No cérebro, a concentração de Cd estava acima do limite de detecção apenas no grupo Fito Mix, e no músculo apenas no grupo Mix.

Na exposição ao Ni isolado, houve bioacumulação de Ni nas brânquias ($H = 17,99$; $p < 0,001$), no fígado ($H = 17,49$; $p < 0,001$) e no cérebro ($F = 34,86$; $p < 0,001$)

dos animais dos grupos Fito Ni e Ni (Fig. 3.4 A). No rim houve aumento da concentração de Ni no grupo Ni ($H = 18,18$; $p < 0,001$) em relação ao CTR. No músculo, houve aumento da concentração de Ni no grupo Ni ($F = 5,57$; $p = 0,017$) em relação aos grupos Fito CTR e Fito Ni, de modo que a concentração deste metal estava abaixo do limite de detecção no grupo CTR.

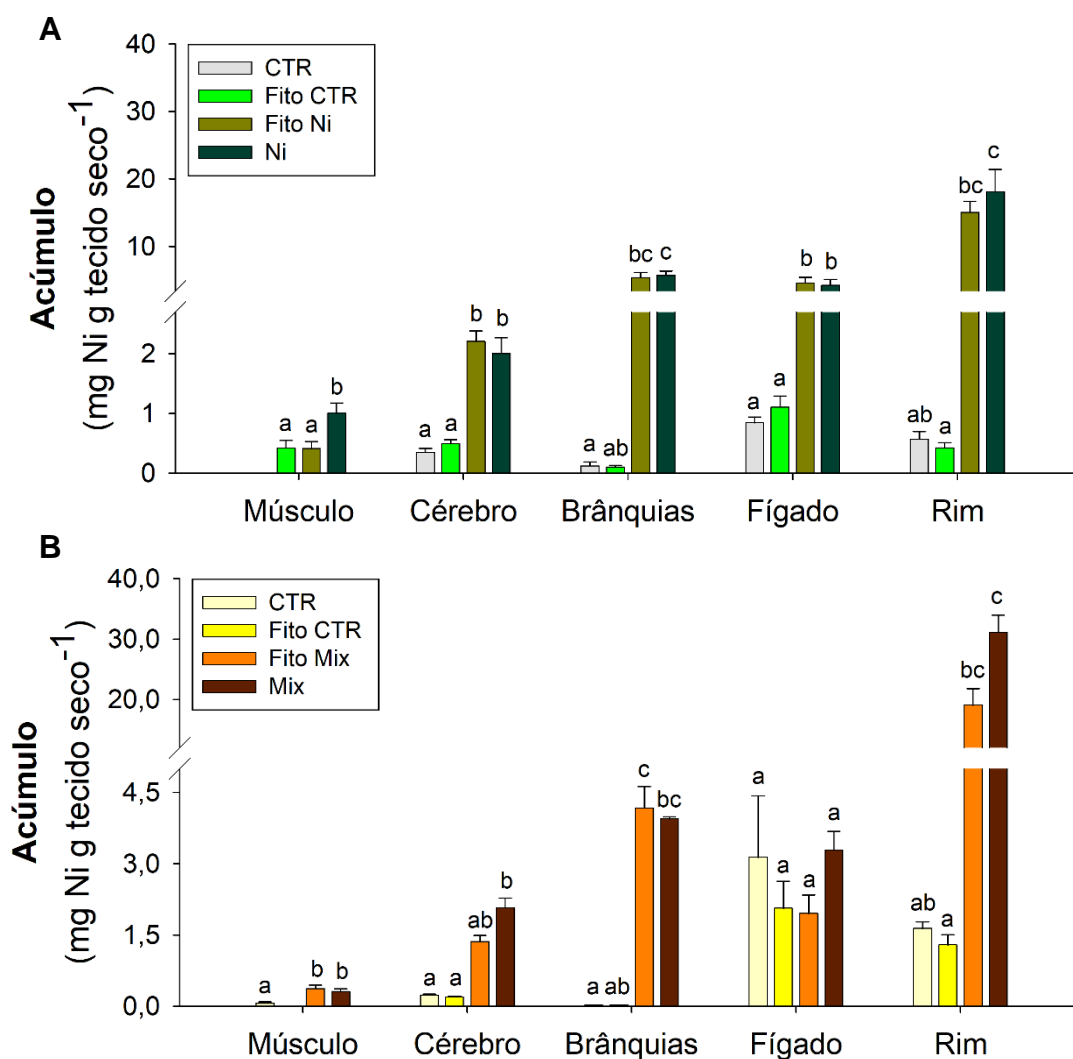
Na macrófita *L. minor* também houve acúmulo de Ni nas amostras do grupo Fito Ni ($U = 0,00$; $p = 0,001$) em relação ao grupo Fito CTR (Tab. 3.1).

Figura 3.3 – Concentração de Cd nos tecidos de *P. lineatus* após exposição de 96 h ao Cd isolado (A) e após exposição de 96 h a mistura de cádmio e níquel (B). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; $n = 4-8$). A concentração de cádmio estava abaixo do limite de detecção nos grupos em que não há uma barra e letras indicando o resultado da análise estatística.



A exposição a mistura de metais também provocou aumento da concentração de Ni nas brânquias ($H = 17,65$; $p < 0,001$) e no músculo ($F = 6,53$; $p = 0,010$) dos peixes dos grupos Fito Mix e Mix (Fig. 3.4 B). Contudo, nas amostras de músculo do grupo Fito CTR a concentração de Ni estava abaixo do limite de detecção. No rim ($H = 18,72$; $p < 0,001$) e no cérebro ($H = 19,02$; $p < 0,001$) apenas os animais do grupo Mix apresentaram aumento significativo da concentração de Ni em relação ao CTR. No fígado não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração de Ni.

Figura 3.4 – Concentração de Ni nos tecidos de *P. lineatus* após exposição de 96 h ao Ni isolado (A) e após exposição de 96 h a mistura de cádmio e níquel (B). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; $n = 5-8$). A concentração de níquel estava abaixo do limite de detecção nos grupos em que não há uma barra e letras indicando o resultado da análise estatística.



Na macrófita *L. minor* foi observado aumento da concentração de Cd ($U = 0,00$; $p < 0,001$) e Ni ($U = 0,00$; $p < 0,001$) nas amostras do grupo Fito Mix em relação ao grupo Fito CTR (Tab. 3.1).

Tabela 3.1 – Concentração de Cd e Ni em amostras de *L. minor* coletadas após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Um asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (média \pm EP; $n = 6-8$).

		Acúmulo de Cd (mg Cd g tecido seco ⁻¹)	Acúmulo de Ni (mg Ni g tecido seco ⁻¹)
Cd	Fito CTR	2,22 \pm 0,27	-
	Fito Cd	733,15 \pm 69,60 *	-
Ni	Fito CTR	-	12,55 \pm 1,07
	Fito Ni	-	1474,23 \pm 74,33 *
Mix	Fito CTR	2,08 \pm 0,15	21,28 \pm 0,96
	Fito Mix	418,45 \pm 17,34 *	1152,28 \pm 37,60 *

3.4.3 Biomarcador de Exposição a Metais

No experimento de exposição ao Cd isolado não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à concentração de metalotioneínas nos três tecidos avaliados. Entretanto, no experimento de exposição ao Ni isolado houve um aumento da concentração de MT no fígado ($F = 3,91$; $p = 0,026$) dos animais do grupo Ni (Fig. 3.5 B). Na brânquia e no músculo não foram observadas alterações.

No experimento de exposição à mistura de metais houve um aumento da concentração dessas proteínas no músculo ($F = 4,213$; $p = 0,018$) dos animais dos grupos Fito Mix e Mix (Fig. 3.5 C). Na brânquia e no fígado não foram observadas alterações significativas.

3.4.4 Biomarcadores Hematológicos, Metabólicos e Osmo-Iônicos

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos quanto aos parâmetros hematológicos avaliados nos três experimentos de exposição (Tab. 3.2). Entretanto, no experimento de exposição à mistura de Cd e Ni, foi observado aumento de glicemia ($F = 5,70$; $p = 0,004$) nos peixes do grupo Mix em relação ao CTR (Fig. 3.6). Nos experimentos de exposição aos metais isolados, não houve alterações em nenhum grupo quanto a este parâmetro.

Figura 3.5 – Concentração de metalotioneínas (MT) nas brânquias, fígado e músculo de *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd (A) ou ao Ni (B) isolados, ou ainda, à sua mistura (C). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 5-8).

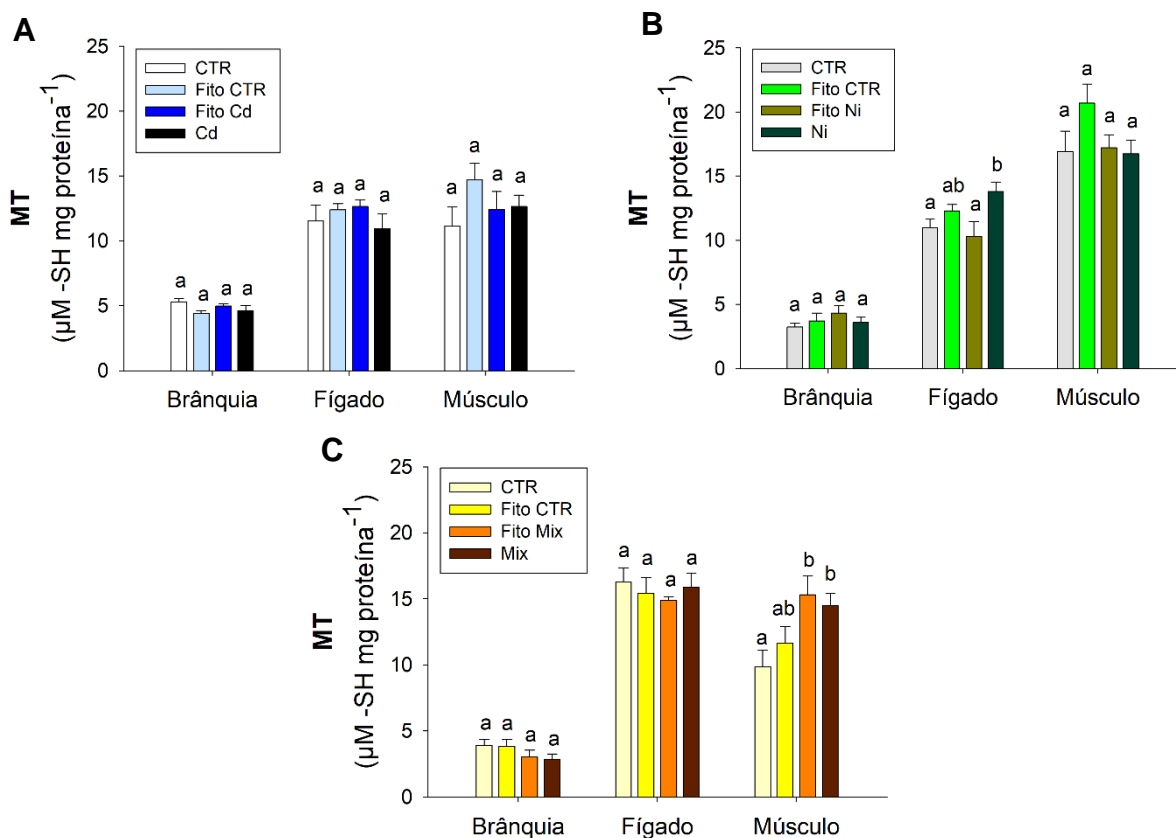


Figura 3.6 – Concentração de glicose plasmática em *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 6-8).

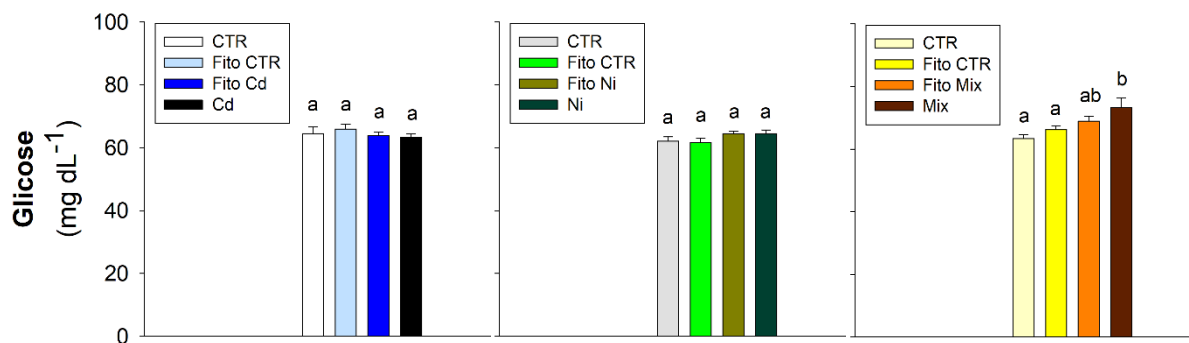


Tabela 3.2 – Concentração de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos (RBC) avaliados em *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 6-8).

		Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Hematócrito (%)	RBC (10 ⁶ mm ³)
<i>Cd</i>	CTR	7,3 \pm 0,2 ^a	31,7 \pm 1,0 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a
	Fito CTR	8,3 \pm 0,3 ^a	32,7 \pm 0,8 ^a	2,2 \pm 0,2 ^a
	Fito Cd	8,5 \pm 0,5 ^a	32,3 \pm 1,8 ^a	1,7 \pm 0,1 ^a
	Cd	8,3 \pm 0,3 ^a	27,8 \pm 1,6 ^a	1,8 \pm 0,0 ^a
<i>Ni</i>	CTR	6,8 \pm 0,4 ^a	22,5 \pm 1,7 ^a	2,1 \pm 0,1 ^a
	Fito CTR	6,3 \pm 0,4 ^a	27,2 \pm 1,8 ^a	1,8 \pm 0,2 ^a
	Fito Ni	6,4 \pm 0,3 ^a	27,0 \pm 1,3 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a
	Ni	6,0 \pm 0,3 ^a	27,9 \pm 1,5 ^a	1,4 \pm 0,1 ^a
<i>Mix</i>	CTR	6,4 \pm 0,7 ^a	24,7 \pm 1,5 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a
	Fito CTR	6,7 \pm 0,5 ^a	27,8 \pm 1,6 ^a	1,5 \pm 0,1 ^a
	Fito Mix	6,9 \pm 0,3 ^a	26,4 \pm 1,7 ^a	1,4 \pm 0,2 ^a
	Mix	6,6 \pm 0,6 ^a	25,8 \pm 1,9 ^a	1,5 \pm 0,1 ^a

Várias alterações foram observadas quanto a concentração dos íons plasmáticos avaliados (Tab. 3.3). No experimento de exposição ao Cd isolado, os animais dos grupos Fito Cd e Cd apresentaram um aumento na concentração de potássio (H = 11,50; p = 0,009) e uma redução na concentração de cálcio (F = 11,63; p < 0,001).

Na exposição ao Ni isolado, houve um aumento na concentração de cálcio (F = 8,42; p < 0,001) nos grupos Fito Ni e Ni.

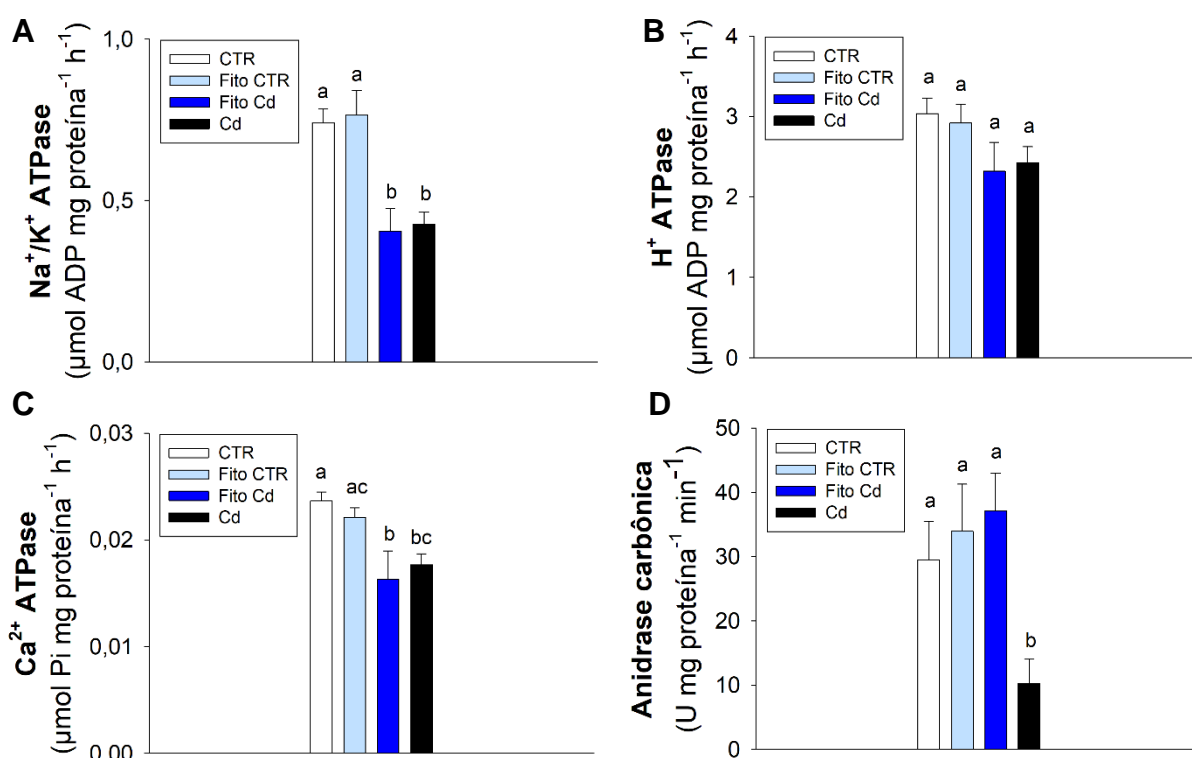
No experimento de exposição à mistura de metais houve uma redução na concentração de potássio (H = 11,12; p = 0,011) nos peixes dos grupos Fito Mix e Mix, em relação ao grupo CTR. Também foi observada uma redução da concentração de cálcio (F = 3,59; p = 0,032) no grupo Mix.

Quanto às enzimas de transporte iônico na brânquia, na exposição ao Cd foi observada uma redução da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase (F = 11,99; p < 0,001) e da Ca²⁺ ATPase (F = 5,56; p = 0,006) nos grupos Fito Cd e Cd. Também houve uma redução na atividade da anidrase carbônica (F = 3,85; p = 0,026) apenas no grupo Cd (Fig. 3.7). Não houve diferença entre os grupos quanto à atividade da H⁺ ATPase.

Tabela 3.3 – Concentração (mM) dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} no plasma de *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 5-8).

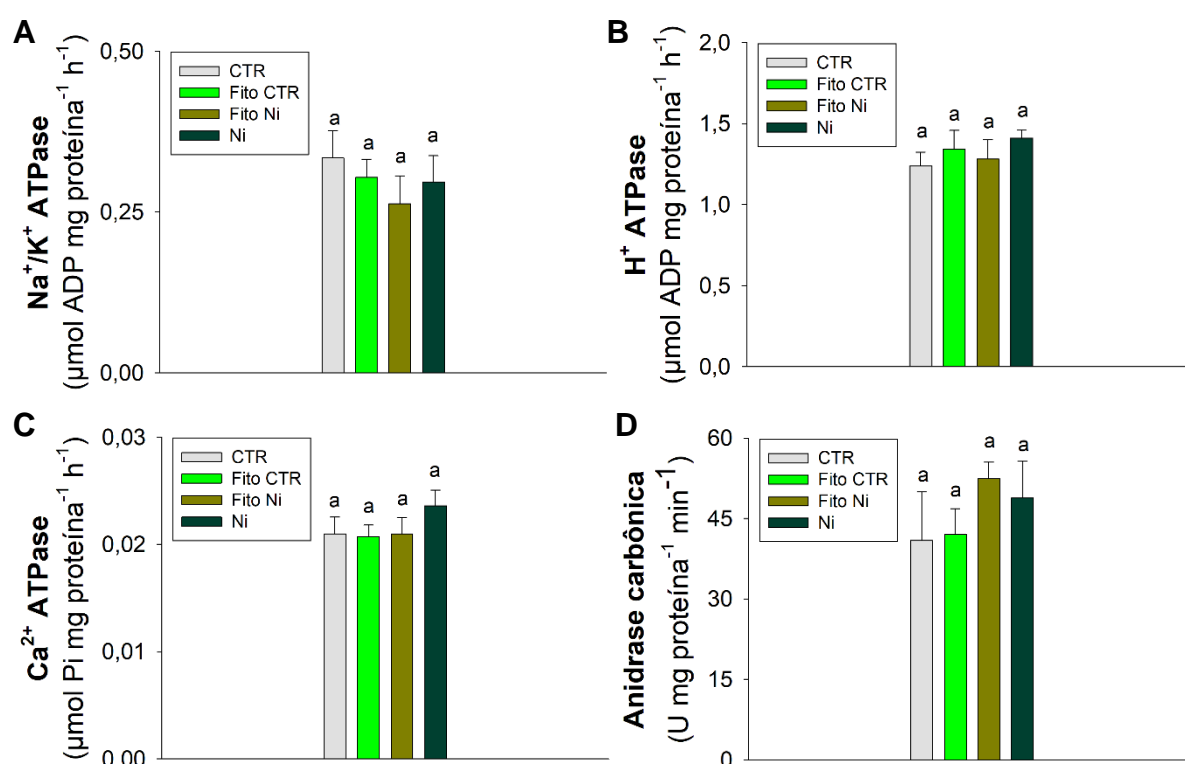
		Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Cl^- (mM)	Ca^{2+} (mM)
<i>Cd</i>	CTR	118,3 \pm 3,8 ^a	2,4 \pm 0,3 ^a	109,4 \pm 2,8 ^a	1,9 \pm 0,1 ^a
	Fito CTR	131,1 \pm 2,8 ^a	2,6 \pm 0,1 ^a	103,6 \pm 2,4 ^a	1,8 \pm 0,0 ^a
	Fito Cd	129,0 \pm 4,1 ^a	3,1 \pm 0,2 ^b	105,5 \pm 3,7 ^a	1,5 \pm 0,0 ^b
	Cd	130,5 \pm 4,6 ^a	3,1 \pm 0,2 ^b	106,1 \pm 2,4 ^a	1,5 \pm 0,1 ^b
<i>Ni</i>	CTR	124,5 \pm 1,1 ^a	3,4 \pm 0,2 ^a	111,9 \pm 3,6 ^a	1,6 \pm 0,0 ^a
	Fito CTR	124,1 \pm 1,6 ^a	3,2 \pm 0,1 ^a	106,3 \pm 3,5 ^a	1,8 \pm 0,1 ^a
	Fito Ni	124,9 \pm 1,4 ^a	3,2 \pm 0,1 ^a	102,7 \pm 1,5 ^a	2,0 \pm 0,1 ^b
	Ni	129,4 \pm 2,3 ^a	3,3 \pm 0,1 ^a	108,0 \pm 3,1 ^a	2,1 \pm 0,0 ^b
<i>Mix</i>	CTR	146,9 \pm 2,6 ^a	3,3 \pm 0,1 ^a	104,1 \pm 3,0 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a
	Fito CTR	144,7 \pm 4,3 ^a	2,9 \pm 0,1 ^{ab}	104,1 \pm 1,6 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a
	Fito Mix	136,4 \pm 4,6 ^a	2,5 \pm 0,2 ^b	104,8 \pm 1,7 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a
	Mix	135,8 \pm 1,3 ^a	2,7 \pm 0,1 ^b	108,1 \pm 1,0 ^a	1,3 \pm 0,1 ^b

Figura 3.7 – Atividade das enzimas Na^+/K^+ ATPase (**A**), H^+ ATPase (**B**) Ca^{2+} ATPase (**C**) e anidrase carbônica (**D**) nas brânquias de *P. lineatus* após 96 h de exposição ao Cd isolado. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 5-8).



Na exposição ao Ni não foi observada diferença entre os grupos quanto à atividade das enzimas Na⁺/K⁺ ATPase, Ca²⁺ ATPase e H⁺ ATPase e anidrase carbônica. Já na exposição à mistura de metais, a única enzima que apresentou alterações foi a Ca²⁺ ATPase, sendo observada uma redução da sua atividade nos peixes do grupo Mix (F = 3,36; p = 0,037) (Fig. 3.9 C).

Figura 3.8 – Atividade das enzimas Na⁺/K⁺ ATPase (A), H⁺ ATPase (B) Ca²⁺ ATPase (C) e anidrase carbônica (D) nas brânquias de *P. lineatus* após 96 h de exposição ao Ni isolado. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).

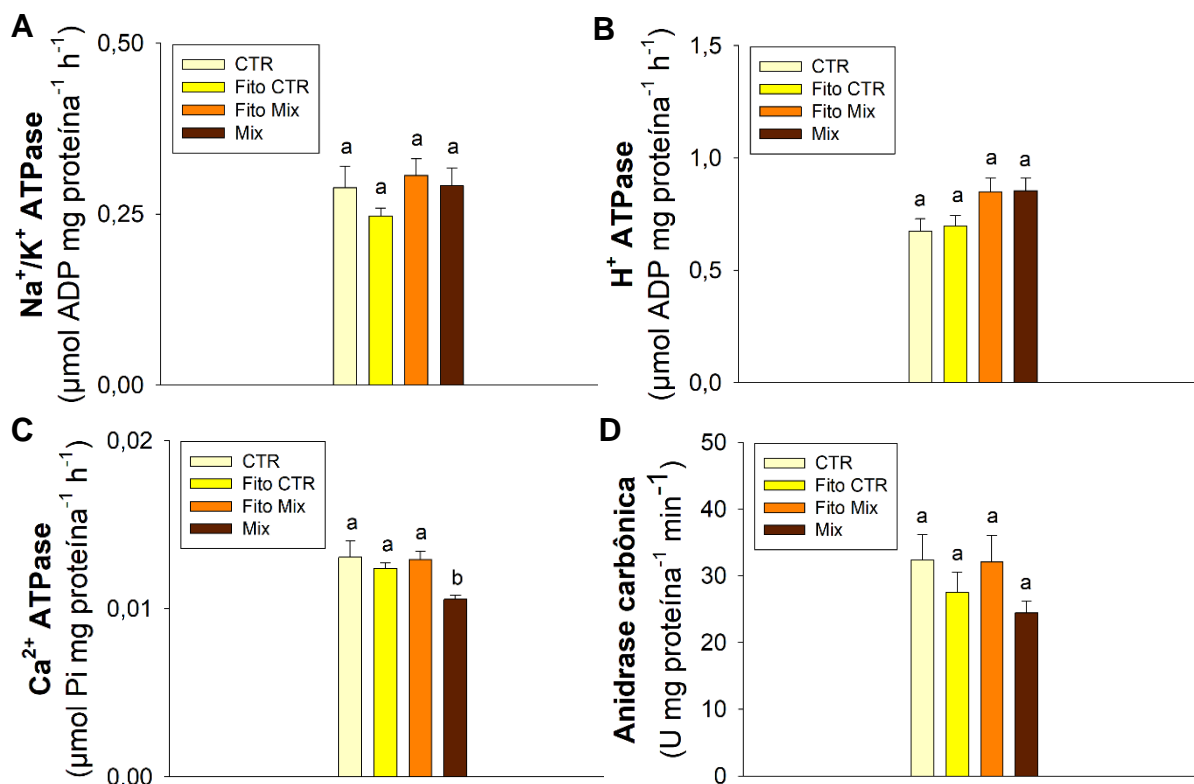


3.4.5 Biomarcador de Neurotoxicidade

Após a exposição ao Cd isolado, os peixes do grupo Cd apresentaram um aumento da atividade da AChE no cérebro (F = 5,84; p = 0,004) e uma redução na atividade desta enzima no músculo (F = 3,28; p = 0,041) (Fig. 3.10 A).

No experimento de exposição ao Ni isolado não houve alteração na atividade da AChE em nenhum dos tecidos testados. Na exposição à mistura também não foram constatadas alterações na AChE no cérebro, no entanto, os animais do grupo Mix apresentaram uma redução da atividade desta enzima no músculo (F = 4,09; p = 0,018) (Fig. 3.10 C).

Figura 3.9 – Atividade das enzimas Na⁺/K⁺ ATPase **(A)**, Ca²⁺ ATPase **(B)**, H⁺ ATPase **(C)** e anidrase carbônica **(D)** nas brânquias de *P. lineatus* após 96 h de exposição à mistura de Cd e Ni. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média ± EP; n = 5-8).



3.4.6 Biomarcadores de Genotoxicidade

Não foi observada diferença significativa entre os grupos do experimento de exposição ao Cd isolado quanto a frequência de AENs. Nesta exposição foram observados apenas dois indivíduos com a presença de um MN cada no grupo Fito Cd.

Na exposição ao Ni isolado houve um aumento da frequência de AENs ($F = 4,86$; $p = 0,009$) nos peixes do grupo Ni (Fig. 3.11 B). Não foram observados micronúcleos em nenhum indivíduo neste experimento de exposição.

Na exposição à mistura de metais também foi observado um aumento na frequência de AENs nos animais do grupo Mix ($F = 6,12$; $p = 0,005$) (Fig. 3.11 C). Nesta exposição foram observados apenas dois MN em um único indivíduo do grupo Fito CTR.

Figura 3.10 – Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo de *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd (**A**) ou ao Ni (**B**) isolados, ou ainda, à sua mistura (**C**). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 5-8).

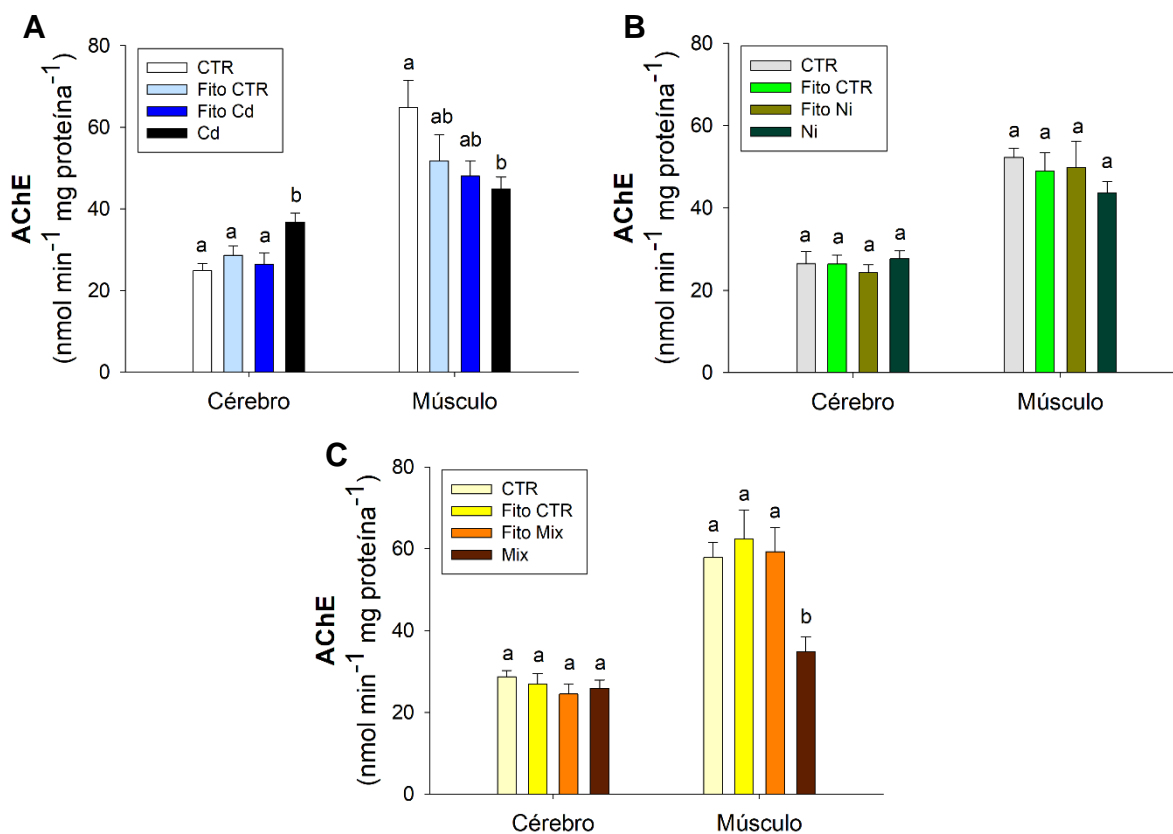
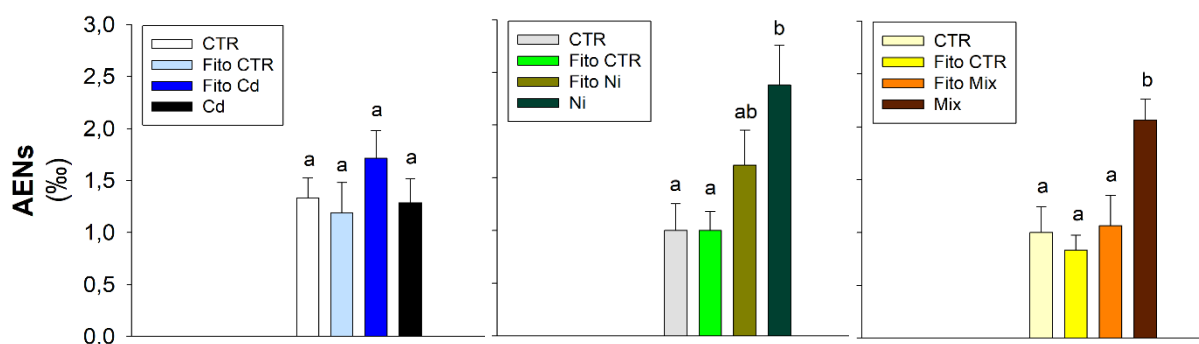


Figura 3.11 – Frequência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) em *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (média \pm EP; n = 5-7).



3.4.7 Biomarcadores Histopatológicos

Na exposição ao Cd isolado não houve diferença entre os grupos quanto ao valor de IAH. A frequência das alterações observadas também não diferiu de modo expressivo entre os grupos. As alterações mais frequentes foram o desarranjo lamelar, e o descolamento epitelial (Tab. 3.4).

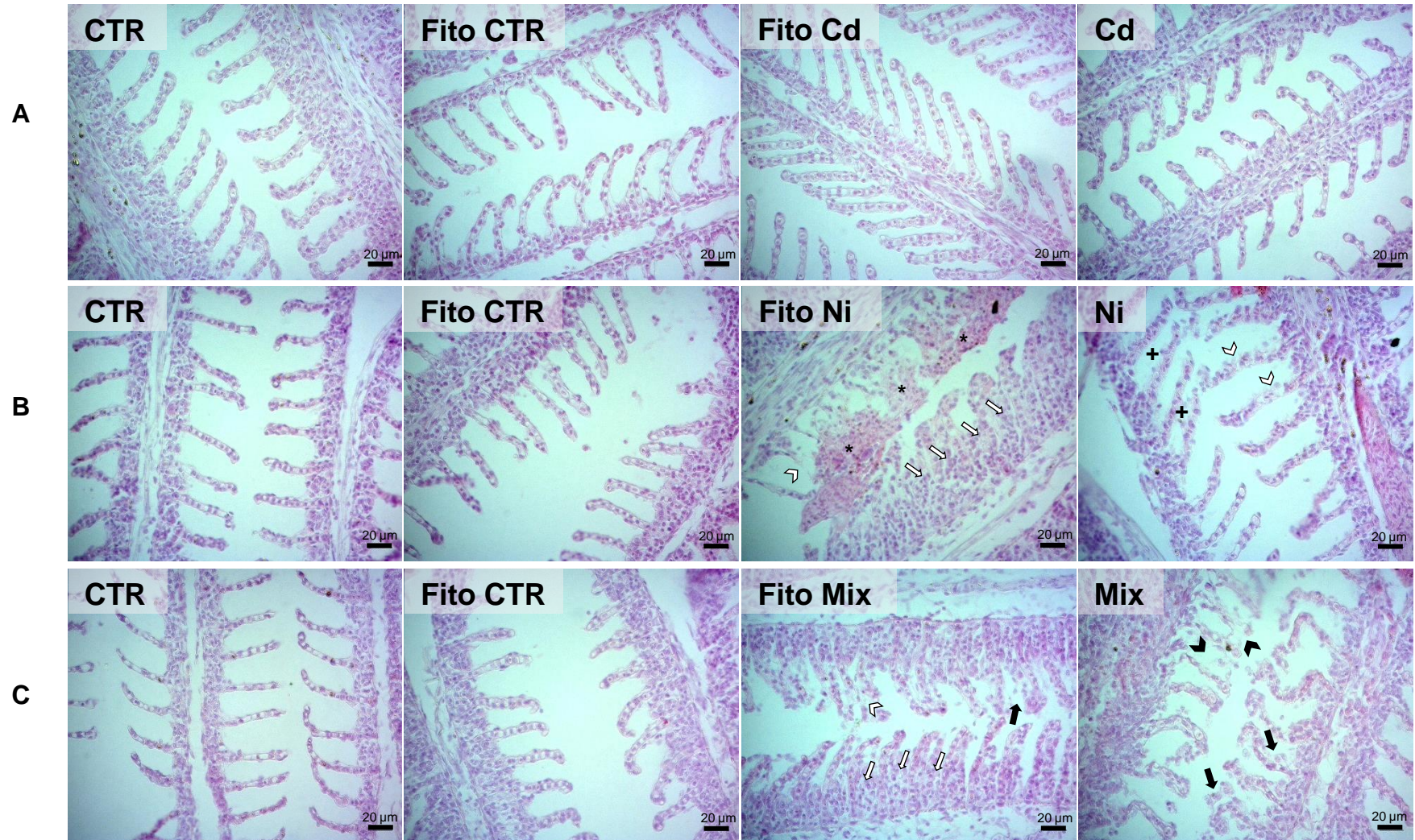
Na exposição ao Ni houve um aumento do IAH ($F = 6,54$; $p = 0,002$) nos grupos Fito Ni e Ni (Tab. 3.4). Nestes mesmos dois grupos foram observadas alterações com grau de severidade II que estavam ausentes no grupo CTR e Fito CTR, como o rompimento de células pilares e hemorragia (Fig. 3.12 B).

Na exposição à mistura de Cd e Ni também houve aumento do IAH ($F = 9,43$; $p < 0,001$) nos animais dos grupos Fito Mix e Mix (Tab. 3.4). Nestes grupos foi observado o rompimento de células pilares, uma alteração ausente nos grupos CTR e Fito CTR, além de um aumento na frequência de descolamento epitelial e desarranjo lamelar (Fig. 3.12 C).

Tabela 3.4 – Frequência de alterações histológicas e índice de alterações histológicas (IAH) nas brânquias de *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd ou ao Ni isolados, ou ainda, à sua mistura. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos quanto ao valor de IAH (média ± EP; n = 5-8). 0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente

Alterações	Grau de severidade	Frequência de ocorrência											
		Cd				Ni				Mix			
		CTR	Fito CTR	Fito Cd	Cd	CTR	Fito CTR	Fito Ni	Ni	CTR	Fito CTR	Fito Mix	Mix
<i>Congestão vascular</i>	I	+	+	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Desarranjo lamelar</i>	I	++	+++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	++
<i>Descolamento epitelial</i>	I	++	+	+	++	+	+	++	++	+	+	++	++
<i>Dilatação do canal marginal</i>	I	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
<i>Fusão completa de várias lamelas</i>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
<i>Fusão incompleta de várias lamelas</i>	I	0	0	0	0	++	+	+	+	++	++	+	+
<i>Hiperplasia do epitélio lamelar</i>	I	+	+	0	0	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Hipertrofia celular</i>	I	++	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+
<i>Presença de parasitas</i>	I	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hemorragia com ruptura do epitélio</i>	II	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Rompimento das células pilares</i>	II	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0
<i>Ruptura do epitélio lamelar</i>	II	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+
IAH		12,9 ^a ± 1,7	12,5 ^a ± 3,4	19,2 ^a ± 2,5	10,0 ^a ± 2,6	13,3 ^a ± 3,1	12,9 ^a ± 3,4	27,1 ^b ± 3,3	25,9 ^b ± 2,4	10,6 ^a ± 2,3	9,8 ^a ± 2,3	25,0 ^b ± 2,7	21,6 ^b ± 2,6

Figura 3.12 – Cortes histológicos das brânquias de *P. lineatus* após exposições de 96 h ao Cd (**A**) ou ao Ni (**B**) isolados, ou ainda, à sua mistura (**C**). Desarranjo lamelar (+); descolamento epitelial (seta preta); hemorragia (*); hiperplasia do epitélio lamelar (seta branca); ruptura do epitélio lamelar (ponta de seta preta); rompimento das células pilares (ponta de seta branca). Coloração com hematoxilina e eosina.



3.5 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou se uma remediação de 96 h mediada por *L. minor* seria capaz de evitar a bioacumulação, bem como outros efeitos subletais em *P. lineatus* devido a exposição aos metais Cd e Ni. O desempenho de *L. minor* na fitorremediação e os resultados de cada experimento de exposição são discutidos separadamente nas seções a seguir.

3.5.1 Uso da *Lemna minor* para Fitorremediação

Em todos os experimentos de exposição *L. minor* apresentou um aumento da concentração de Cd e/ou Ni em seus tecidos, quando exposta a estes metais. O Cd é um metal não essencial, entretanto, ele pode ser captado pelas raízes das plantas através de canais ou transportadores de Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} . Uma vez dentro das células o Cd geralmente se liga a agentes quelantes, como a glutatona (GSH), e é transportado para o vacúolo (Clemens, 2006). Desse modo, estes processos podem ser responsáveis pelo acúmulo de Cd observado em *L. minor* neste estudo.

O Ni, porém, é um metal essencial para as plantas, estando presente na composição de enzimas como a urease, por exemplo. Este metal é predominantemente absorvido pelas raízes, por meio de processos de transporte ativo e passivo (Seregin e Kozhevnikova, 2006). Acredita-se que o Ni é captado pelos mesmos transportadores de cátions pelos quais são absorvidos o Cu^{2+} e o Zn^{2+} . A partir da raiz, o Ni pode ser transportado pelo xilema e floema, sendo então distribuído a todo o organismo (Sachan e Lal, 2017). Estes mecanismos de transporte provavelmente estão envolvidos no acúmulo de Ni observado em *L. minor* neste trabalho.

Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade de *L. minor* de extrair Cd e Ni da água, e de acumular estes metais em seus tecidos (Appenroth et al., 2010; Bharti e Banerjee, 2012). Contudo, nas exposições ao Ni isolado e à mistura de metais não houve diferença entre a concentração de metal nos meios de exposições com e sem fitorremediação. Este resultado pode estar relacionado a outro mecanismo de remediação que não envolve a extração dos metais da água. Segundo diversos autores, algumas plantas podem imobilizar ou “sequestrar” os metais presentes no meio de exposição através da sua adsorção na superfície das raízes, por um processo conhecido como fitoestabilização (Iqbal et al., 2019; Jeevanantham et al., 2019).

Desse modo, não haveria necessariamente a remoção de Cd e Ni da água, porém, estes metais estariam menos disponíveis para os peixes, pois *P. lineatus* é uma espécie com hábito detritívoro (Castro e Vari, 2004), que não costuma nadar próximo à superfície da água.

Além disso, deve-se pontuar os outros fatores que podem estar envolvidos na variação da concentração de Cd e Ni nos meios de exposição, independentemente da presença ou não de *L. minor*. Este resultado pode ter sido provocado, em parte, pela absorção destes metais pelos peixes, o que resultou na bioacumulação em diversos tecidos de *P. lineatus*. A variação na concentração de Cd e Ni também pode ser atribuída à formação de complexos entre os íons metálicos e o material orgânico em suspensão. Estes complexos geralmente não permanecem na coluna d'água e acabam se depositando no fundo (Couture e Pyle, 2011).

Outro aspecto a ser observado sobre os três experimentos de exposição é que o grupo Fito CTR não apresentou alterações em relação ao CTR em nenhum dos biomarcadores avaliados. Estes resultados indicam que *L. minor* é uma alternativa segura para a fitorremediação de metais, não oferecendo riscos para a saúde de *P. lineatus*. Contudo, deve-se destacar que esta espécie de macrófita aquática tem potencial invasor e não deve ser utilizada levemente para recuperação de ambientes naturais. Estratégias para o seu uso em sistemas de tratamento de efluentes e águas residuais devem ser desenvolvidas com cautela, evitando assim a ocorrência de impactos ambientais (Prabakaran et al., 2019).

3.5.2 Exposição ao Cádmio Isolado

A exposição ao Cd provocou diversas alterações em *P. lineatus*, como bioacumulação em vários tecidos, neurotoxicidade, redução na atividade de enzimas de transporte iônico, além de desbalanços na concentração de íons plasmáticos. A fitorremediação foi completamente efetiva em evitar efeitos neurotóxicos no cérebro e o acúmulo de Cd rim. A atividade da enzima AChE no músculo e o acúmulo de Cd no cérebro não diferiram entre os grupos Fito Cd e Cd, porém esses parâmetros apresentaram uma melhora nos animais do grupo Fito Cd, e conseqüentemente, não diferiram significativamente dos valores do grupo CTR.

Segundo McGeer et al. (2011), em peixes o Cd pode ser captado pelas brânquias através de canais de cálcio voltagem-dependentes, pela Ca^{2+} ATPase ou também pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A partir das brânquias, esse metal provavelmente atingiu a corrente

sanguínea e foi transportado para outros tecidos (Wood, 2011), o que resultou na bioacumulação no cérebro, fígado, rim e brânquias nos animais do grupo Cd.

Nos peixes expostos à fitorremediação do Cd, houve bioacumulação apenas no fígado e brânquias. O fígado é o principal tecido responsável pela detoxificação e armazenamento de metais (Palermo et al., 2015). Já as brânquias apresentam grande superfície de contato, são altamente vascularizadas e estão permanentemente em contato com o meio externo (Atli e Canli, 2011). Desse modo, a fitorremediação não pôde evitar o acúmulo de metal, provavelmente devido a estas características particulares desses tecidos.

Além da bioacumulação, a exposição ao Cd também provocou um aumento da concentração de K^+ e uma redução da concentração de Ca^{2+} no plasma. Sabe-se que um dos principais mecanismos de toxicidade do Cd em peixes envolve a inibição de enzimas envolvidas na osmorregulação, o que resulta em desequilíbrios iônicos (McGeer et al., 2011). Como a NKA é responsável por promover a entrada de K^+ nas células e a saída de Na^+ em direção ao líquido intersticial (Hwang, 2011), o aumento da concentração de K^+ no plasma pode ter ocorrido devido à redução da atividade dessa enzima na brânquia.

A redução da concentração de Ca^{2+} plasmático, por sua vez, pode ter ocorrido devido à redução atividade da enzima Ca^{2+} ATPase, o que ocasionaria uma captação de menores quantidades desse íon (Nikinmaa, 2014).

A anidrase carbônica também teve sua atividade reduzida devido à exposição ao Cd no presente estudo. Este efeito pode ter ocorrido devido à competição entre o Cd^{2+} e o Zn^{2+} por sítios de ligação na AC. Como o zinco atua como cofator enzimático, a competição com o Cd pode ter sido responsável pela redução da atividade da AC (da Silva e Martinez, 2014).

A fitorremediação não impediu a maioria das alterações na concentração de íons e nas enzimas de transporte observadas em *P. lineatus*, provavelmente devido à bioacumulação de Cd nas brânquias. Como este tecido é o principal órgão envolvido nos processos de osmorregulação em peixes (Bjerregaard et al., 2015) e o Cd estava presente nele em uma concentração muito alta, ocorreram alterações na atividade das enzimas NKA e CaATP mesmo com a redução da concentração de metal no meio de exposição.

Outro efeito provocado pela exposição ao Cd foi o aumento da atividade da AChE no cérebro e a redução da atividade desta mesma enzima no músculo. De

acordo com Bainy et al. (2006) os metais podem bloquear os receptores de acetilcolina, dificultando o acesso aos sítios de ligação da enzima. Esse cenário poderia causar um aumento na síntese de AChE, numa resposta de compensação para decompor a acetilcolina acumulada. Como houve acúmulo de Cd no cérebro dos peixes do grupo Cd, esta seria uma possível explicação para o aumento da atividade da AChE observado neste trabalho.

Entretanto, nas amostras de músculo do grupo Cd houve um efeito oposto ao do cérebro, provavelmente indicando uma resposta tecido-dependente, assim como observado em zebrafish (Zhang, et al., 2017). A redução na atividade da AChE pode estar relacionada a alterações fisiológicas provocadas pela exposição ao metal, que indiretamente resultam na redução da atividade desta enzima (Lima et al., 2013). No trabalho de Naik et al. (2020) o peixe *Oreochromis mossambicus* também apresentou reduções na atividade da AChE no músculo, após exposições agudas e subcrônicas ao Cd.

Contudo, a fitorremediação foi efetiva em evitar a ocorrência de efeitos neurotóxicos tanto no cérebro quanto no músculo de *P. lineatus*. A ausência de alterações na AChE no cérebro provavelmente é um reflexo dos resultados observados quanto a bioacumulação, uma vez que não foi observado um aumento significativo da concentração de Cd nesse tecido no grupo Fito Cd.

3.5.3 Exposição ao Níquel Isolado

A exposição ao Ni provocou bioacumulação, indução de MT, hipercalcemia, maior ocorrência de danos histológicos nas brânquias, além de um aumento da frequência de AENs. A fitorremediação evitou a indução de MT e o acúmulo de Ni no músculo. O acúmulo de Ni no rim e a frequência de AENs foram parâmetros que não diferiram entre os animais dos grupos Fito Ni e Ni, contudo, a fitorremediação foi efetiva em reduzir esses efeitos no grupo Fito Ni, de modo que esses biomarcadores não mais apresentassem diferença significativa com o grupo CTR.

No trabalho de Alsop e Wood (2011), foi demonstrado que o aumento da concentração de Ca^{2+} no meio de exposição diminui a absorção e a toxicidade do Ni, indicando que o Ni^{2+} pode ser captado pelos peixes por meio de canais de cálcio. Desse modo, a partir das brânquias o Ni poderia atingir a corrente sanguínea e se acumular em outros tecidos, assim como observado para o Cd no presente estudo.

A fitorremediação do Ni não evitou a bioacumulação nas brânquias e no fígado,

possivelmente pelos mesmos fatores já discutidos para a exposição ao Cd isolado. Além disso, no fígado dos peixes do grupo Ni também houve um aumento da concentração de metalotioneínas. As MT possuem uma grande quantidade de grupamentos sulfidríla que podem se ligar a íons metálicos e evitar interações fisiológicas que resultem em toxicidade (Pyle e Couture, 2011). A indução da síntese dessas proteínas é um mecanismo comum de defesa dos peixes em resposta a um aumento da concentração de metais no organismo (Nikinmaa, 2014).

Entretanto, mesmo com a fitorremediação ainda houve acúmulo de Ni no cérebro dos animais do grupo Fito Ni. Segundo Pyle e Couture (2011), em peixes o Ni também pode ser captado pelo epitélio olfatório, em exposições via água. Como neurônios receptores constituem um dos principais tipos celulares presentes no epitélio sensorial deste tecido (Hara, 2011), o Ni poderia ser transportado com maior facilidade para o cérebro por esta via.

O Ni é um metal conhecido por ter mecanismos de toxicidade mais relacionados a lesões no tecido branquial, ao contrário da maioria dos metais, que causam distúrbios ionorregulatórios (Pane et al., 2003). Contudo, no presente estudo houve uma hipercalcemia em *P. lineatus*, após a exposição ao Ni.

Como não houve alteração na atividade da CaATP branquial, a exposição ao Ni pode ter interferido nos mecanismos endócrinos de regulação de Ca^{2+} , envolvendo hormônios como stanniocalcina e a calcitonina, por exemplo. Sabe-se que a calcitonina tem efeito sobre a mobilização de cálcio do tecido ósseo (Loewn et al., 2016). Contudo, futuros estudos são necessários para confirmar esta hipótese, uma vez que os efeitos dos Ni sobre o sistema endócrino têm sido estudados principalmente apenas em mamíferos (Georgescu et al., 2011; Yang e Ma, 2021).

Outra resposta observada em *P. lineatus* após a exposição ao Ni foi o aumento da frequência de AENs. Segundo Shimizu et al. (1998) alterações na forma do núcleo podem ocorrer devido a processos de exocitose desencadeados para reparar ou eliminar material genético danificado.

No estudo de Palermo et al. (2015), exposições agudas ao Ni provocaram um aumento de quebras no DNA em eritrócitos de *P. lineatus*. Já o peixe *Paralichthys olivaceus* também apresentou alterações na morfologia do núcleo de seus eritrócitos quando exposto por 7 e 28 dias a diferentes concentrações de Ni (Sun et al., 2020).

A fitorremediação foi eficiente em evitar o aumento da frequência de AENs em *P. lineatus*, possivelmente indicando que havia uma menor quantidade de Ni

circulando na corrente sanguínea dos peixes. A ocorrência de acúmulo de Ni em um menor número de tecidos nos animais do grupo Fito Ni também respalda esta hipótese.

Após a exposição ao Ni também foi observado um aumento do IAH nos grupos Fito Ni e Ni, indicando a ocorrência de danos moderados no tecido branquial. Outros trabalhos já haviam relatado a ocorrência de alterações como edemas, descolamento epitelial, proliferação de células cloreto, espessamento lamelar, dentre outros, devido a exposição a este metal (Topal et al., 2017; Sun et al., 2020). Acredita-se que os danos morfológicos causados devido a exposição ao Ni podem ocorrer como consequência de um extensivo dano oxidativo ao tecido (Pyle e Couture, 2011).

A ineficácia da fitorremediação em evitar as alterações histológicas no tecido branquial provavelmente está relacionada ao acúmulo de Ni neste mesmo tecido, efeito que também não foi evitado no grupo Fito Ni, como já discutido anteriormente.

3.5.4 Exposição à Mistura de Cádmio e Níquel

A exposição à mistura de Cd e Ni resultou na bioacumulação de Cd e Ni em diversos tecidos, indução de metalotioneínas, redução da atividade da AChE, aumento da glicemia, desbalanços iônicos, maior frequência de alterações histológicas na brânquia e aumento da frequência de AENs. A fitorremediação evitou a ocorrência da hipocalcemia, a redução da atividade da AChE e o aumento da frequência de AENs. O acúmulo de Ni no cérebro e no rim, e a hiperglicemia não diferiram entre os grupos Fito Mix e Mix, no entanto, a fitorremediação promoveu uma melhora nesses biomarcadores, de modo que os resultados destes parâmetros não diferiram entre os grupos CTR e Fito Mix.

Nos peixes expostos à fitorremediação da mistura, além do aumento da concentração de Cd e Ni nas brânquias, a bioacumulação de Cd no rim e de Ni no músculo também não foram evitados.

Como o rim é um tecido muito importante para a excreção de metais (Vinodhini e Narayanan, 2008), a fitorremediação parece não ter sido suficiente para evitar o acúmulo nesse tecido durante a exposição a uma mistura de metais. Já no músculo, o aumento da concentração de Ni nos animais dos grupos Fito Mix e Mix, certamente está ligada à indução de metalotioneínas nesse tecido, que também ocorreu nesses grupos.

Outro efeito subletal provocado pela exposição à mistura de metais foi o aumento

da concentração de glicose plasmática no grupo Mix, o que provavelmente indica que os peixes deste grupo apresentaram uma resposta de estresse.

A resposta de estresse se inicia com a liberação de hormônios como a adrenalina e o cortisol, que alteram o padrão de distribuição do oxigênio e de moléculas que atuam como fonte de energia, como a glicose. Dessa forma, ocorrem respostas fisiológicas características, como o aumento da concentração da glicose, que se mantém prontamente disponível para a musculatura esquelética (Schreck et al., 2016).

Em peixes, o aumento do aporte sanguíneo nas brânquias, para maximizar a captação de oxigênio é outra resposta fisiológica característica durante o estresse. Contudo, esse aumento da permeabilidade branquial também pode provocar maior efluxo de íons e influxo de água (Reid, 2011; Wendelaar Bonga, 2011). Desse modo, um leve aumento na permeabilidade branquial pode ter provocado as alterações na concentração de K^+ e Ca^{2+} observadas neste estudo, uma vez que estes íons estão presentes no plasma em uma concentração muito mais baixa que o Na^+ e o Cl^- , sendo então mais suscetíveis a alterações devido ao influxo de água no organismo.

Contudo, a fitorremediação foi efetiva em atenuar a resposta de estresse em *P. lineatus*, uma vez que a glicemia dos animais do grupo Fito Mix não foi significativamente diferente dos animais do grupo CTR.

A hipocalcemia observada no grupo Mix também pode estar relacionada à redução da atividade da enzima CaATP (um efeito já discutido para o Cd anteriormente), e a uma competição do íon Ca^{2+} com o Ni^{2+} na captação pela brânquia, como já observado em estudos anteriores com exposições ao Ni (Pane et al., 2006; Alsop e Wood, 2011). Estes fatores podem estar atuando em conjunto, uma vez que foi observado acúmulo de Cd e Ni nas brânquias dos animais do grupo Mix. No entanto, a fitorremediação foi eficaz em evitar a redução da atividade da CaATP e a consequente hipocalcemia nos animais do grupo Fito Mix

A exposição à mistura de Cd e Ni também provocou alterações no biomarcador de neurotoxicidade avaliado em *P. lineatus*. A redução da AChE no músculo dos animais do grupo Mix pode estar relacionada principalmente ao Cd, uma vez que na exposição a este metal isolado também houve redução da atividade desta enzima, mesmo sem a ocorrência de bioacumulação no músculo.

Contudo, como foi observado acúmulo de Ni no músculo, ambos os metais podem ter contribuído para a redução na atividade da AChE. No trabalho de Topal et

al. (2015), exemplares de *Oncorhynchus mykiss* também apresentaram redução da atividade da AChE após uma exposição de 21 dias às concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ de Ni.

No presente estudo, a indução de MT no músculo provavelmente foi protetiva no grupo Fito Mix, evitando as alterações da atividade da AChE neste grupo.

A mistura de Cd e Ni também foi responsável por um aumento da frequência de AENs nos animais do grupo Mix. Os resultados da análise de acúmulo nos diversos tecidos avaliados indicam que tanto o Cd quanto o Ni estavam circulando na corrente sanguínea dos peixes, de modo que estes dois metais poderiam interagir com os eritrócitos e provocar um aumento de AENs.

Na seção anterior já foram discutidos outros trabalhos nos quais o Ni provocou aumento de danos em eritrócitos. O Cd, por sua vez, também pode aumentar a frequência de MN e AENs em peixes, assim como observado nos trabalhos de Mahrous et al. (2015) e Pereira et al. (2016).

No entanto, no presente estudo a fitorremediação evitou o aumento da frequência de AENs nos animais do grupo Fito Mix. Este resultado pode estar relacionado a menores quantidades de Ni circulando no organismo, uma vez que não houve aumento significativo de Ni no rim e no cérebro nos animais do grupo Fito Mix.

A exposição à mistura de metais também provocou um aumento do IAH nos grupos Fito Mix e Mix. Os valores médios de IAH para estes grupos indicam a presença de danos moderados nas brânquias. Como já discutido na seção anterior, o níquel provoca toxicidade em peixes por mecanismos que envolvem principalmente danos ao tecido branquial. Deste modo, este metal pode ser o principal responsável pelas alterações histológicas observadas nos grupos Fito Mix e Mix, uma vez que houve acúmulo de Ni deste tecido.

No entanto, o Cd pode ter contribuído para o aumento de IAH, uma vez que este metal também se acumulou nos animais dos grupos Fito Mix e Mix. Estudos anteriores já demonstraram que peixes expostos ao Cd podem apresentar alterações no tecido branquial como hiperplasia, congestão (Mahrous et al., 2015), ruptura e hipertrofia celular nas lamelas (Adam et al., 2019), além de edemas e aumento do número de células mucosas (Chen et al., 2021).

Além disso, assim como na exposição ao Ni isolado, a fitorremediação não pôde evitar a ocorrência de alterações histológicas após a exposição à mistura de Cd e Ni. Este resultado provavelmente se deve ao acúmulo de metais no tecido branquial, que

também não foi atenuado pela fitorremediação.

3.6 CONCLUSÃO

A fitorremediação mediada pela macrófita aquática *L. minor* pode evitar alguns dos efeitos subletais provocados em *P. lineatus* devido à exposição aos metais Cd e Ni. No entanto, uma remediação de 96 h não é suficiente para evitar a ocorrência de alterações histológicas, desbalanços iônicos e o acúmulo de metais, principalmente nas brânquias, neste teleósteo. Talvez, estes efeitos possam ser mitigados em meios de exposição remediados por um período de tempo mais longo ou com a utilização de maiores quantidades de macrófitas para a remediação.

Contudo, *L. minor* se mostrou como uma alternativa promissora para a fitorremediação de Cd e Ni da água, acumulando estes metais em seus tecidos e reduzindo a sua concentração nos meios de exposição. Conseqüentemente, uma resposta de estresse, bem como alterações na atividade da AChE e na frequência de AENs puderam ser evitadas em *P. lineatus*.

3.7 AGRADECIMENTOS

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

3.8 REFERÊNCIAS

- Adam, M.A., Maftuch, M., Kilawati, Y., Risjani, Y. (2019). The effect of cadmium exposure on the cytoskeleton and morphology of the gill chloride cells in juvenile mosquito fish (*Gambusia affinis*). The Egyptian Journal of Aquatic Research 45(4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.011>
- Alsop, D., Wood, C.M. (2011). Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. Aquatic Toxicology 105(3–4), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.010>

- Alves, L.C., Wood, C.M. (2006). The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic Toxicology* 78(3), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.005>
- Appenroth, K.J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W., Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78(3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>
- Asad, S.A., Farooq, M., Afzal, A., West, H. (2019). Integrated phytobial heavy metal remediation strategies for a sustainable clean environment - A review. *Chemosphere* 217, 925–941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.021>
- Atli, G., Canli, M. (2013). Metals (Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+}) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environmental Toxicology* 28(12), 707–717. <https://doi.org/10.1002/tox.20766>
- Bainy, A.C.D., de Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., de Almeida, E.A. (2006). *In vivo* effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* 19(1), 35–39.
- Bharti, S., Banerjee, T.K. (2012). Phytoremediation of the coalmine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.009>
- Bharti, S., Banerjee, T.K. (2013). Bioassay analysis of efficacy of phytoremediation in decontamination of coal mine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.004>
- Bjerregaard, P., Andersen, C.B.I., Andersen, O. (2015). Ecotoxicology of metals—sources, transport, and effects on the ecosystem. In: Nordberg, B.A., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds), *Handbook on the Toxicology of Metals*, v. I, General Considerations, 4th ed. Academic Press, pp. 425–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00021-4>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation 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)
- Brix, K.V., Schlekot, C.E., Garman, E.R. (2017). The mechanisms of nickel toxicity in aquatic environments: An adverse outcome pathway analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(5), 1128–1137. <https://doi.org/10.1002/etc.3706>

- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S. (2012). Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.10.003>
- Carolin, C.F., Kumar, P.S., Saravanan, A., Joshiba, G.J., Naushad, M. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5(3), 2782–2799. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.029>
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47(11), 2123–2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>
- Castro, R.M.C., Vari, R.P. (Eds). (2004). *Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study*. Smithsonian Contributions to Zoology, Washington. 189 p.
- Chen, J., Xu, Y., Han, Q., Yao, Y., Xing, H., Teng, X. (2019). Immunosuppression, oxidative stress, and glycometabolism disorder caused by cadmium in common carp (*Cyprinus carpio* L.): Application of transcriptome analysis in risk assessment of environmental contaminant cadmium. *Journal of Hazardous Materials* 366, 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.014>
- Chen, J., Chen, D., Li, J., Liu, Y., Gu, X., Teng, X. (2021). Cadmium-induced oxidative stress and immunosuppression mediated mitochondrial apoptosis via JNK-FoxO3a-PUMA pathway in common carp (*Cyprinus carpio* L.) gills. *Aquatic Toxicology* 233, 105775. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105775>
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11), 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Conte, A.A. (2016). Ecoeficiência, logística reversa e a reciclagem de pilhas e baterias: revisão. *Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)* 39, 124–139. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820167114>
- Costa, J.R.M.A., Mela, M., de Assis, H.C.D.S., Pelletier, É., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>

- Costa, M.B., Tavares, F.V., Martinez, C.B.R., Colares, I.G., Martins, C.D.M.G. (2018). Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 155, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.062>
- Couture, P., Pyle, G. (2011). Field studies on metal accumulation and effects in fish. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, pp 417–473. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31009-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31009-6)
- da Silva, A.O., Martinez, C.B.R. (2014). Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. *Aquatic Toxicology* 156, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.009>
- de Lima, D., Roque, G.M., de Almeida, E.A. (2013). *In vitro* and *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research* 91, 45–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>
- Dew, W.A., Veldhoen, N., Carew, A.C., Helbing, C.C., Pyle, G.G. (2016). Cadmium-induced olfactory dysfunction in rainbow trout: Effects of binary and quaternary metal mixtures. *Aquatic Toxicology* 172, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.018>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Georgescu, B., Georgescu, C., Dărăban, S., Bouaru, A., Pașcalău, S. (2011). Heavy metals acting as endocrine disrupters. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 44(2), 89–93.
- Gibbs, A., Somero, G.N. (1989). Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *Journal of Experimental Biology* 143, 475–492.
- Goswami, S., Das, S. (2018). *Eichhornia crassipes* mediated copper phytoremediation and its success using catfish bioassay. *Chemosphere* 210, 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.044>
- Hara, T.J. (2011). Morphology of the Olfactory (Smell) System in Fishes. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 1, The Senses, Supporting Tissues, Reproduction, and Behavior. Academic Press, pp.

194–207.

- Hwang, P.P. (2011). Mechanisms of Ion Transport in Freshwater Fishes. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostatis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 1359–1365.
- Iqbal, N., Hayat, M.T., Zeb, B.S., Abbas, Z., Ahmed, T. (2019). Phytoremediation of Cd-Contaminated Soil and Water. In: Hasanuzzaman, M., Prasad, M.N.V., Fujita, M. (Eds.), *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Academic Press, pp. 531–543. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00021-8>
- Jeevanantham, S., Saravanan, A., Hemavathy, R.V., Kumar, P.S., Yaashikaa, P.R., Yuvaraj, 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>
- Klein, C., Costa, M. (2015). Nickel. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, v. II, Specific Metals, 4th ed. Academic Press, pp. 1091–1111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00048-2>
- Loewen, T.N., Carriere, B., Reist, J.D., Halden, N.M., Anderson, W.G. (2016). Linking physiology and biomineralization processes to ecological inferences on the life history of fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 202, 123–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.017>
- Mahrous, K.F., Hassan, A.M., Radwan, H.A., Mahmoud, M.A. (2015). Inhibition of cadmium-induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.054>
- McCormick, S.D. (1992). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺K⁺ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50(3), 656–658. <https://doi.org/10.1139/f93-075>
- McGeer, J.C., Niyogi, S., Smith, D.S. (2011). Cadmium. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 B, Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Academic Press, pp 125–184. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31025-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31025-4)
- Naija, A., Kestemont, P., Chénais, B., Haouas, Z., Blust, R., Helal, A.N., Marchand, J.

- (2017). Cadmium exposure exerts neurotoxic effects in peacock blennies *Salaria pavo*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.041>
- Naik, A.P., Shyama, S.K., D'Costa, A.H. (2020). Evaluation of genotoxicity, enzymatic alterations and cadmium accumulation in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* exposed to sub lethal concentrations of cadmium chloride. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.enccoco.2020.07.006>
- Nakbanpote, W., Meesungnoen, O., Prasad, M.N.V. (2016). Potential of ornamental plants for phytoremediation of heavy metals and income generation. In: Pasad, M.N.V. (Ed), *Bioremediation and Bioeconomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802830-8.00009-5>
- Nikinmaa, M. (2014). *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Academic Press, Oxford. 240 p.
- Niyogi, S., Nadella, S.R., Wood, C.M. (2015). Interactive effects of waterborne metals in binary mixtures on short-term gill–metal binding and ion uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 165, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.016>
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. (2006). Test n° 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R. (2015). Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 116, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>
- Pane, E.F., Richards, J.G., Wood, C. M. (2003). Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquatic Toxicology* 63(1), 65–82. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00131-5)
- Pane, E.F., McDonald, M.D., Curry, H.N., Blanchard, J., Wood, C.M., Grosell, M. (2006). Hydromineral balance in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) exposed to waterborne or infused nickel. *Aquatic Toxicology* 80(1), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.015>
- Panfili, I., Bartucca, M.L., Ballerini, E., Del Buono, 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>
- Pereira, L.S., Ribas, J.L.C., Vicari, T., Silva, S.B., Stival, J., Baldan, A.P., Domingos, F.X.V., Grassi, M.T., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C. (2016). Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 130, 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.046>
- Prabakaran, K., Li, J., Anandkumar, A., Leng, Z., Zou, C.B., Du, D. (2019). Managing environmental contamination through phytoremediation by invasive plants: A review. *Ecological Engineering* 138, 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.07.002>
- Poleksić, V., Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, Oxford, pp. 339–352.
- Pyle, G., Couture, P. (2011). Nickel. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, London, pp 253–289. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31005-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31005-9)
- Reid, S.G. (2011). Catecholamines. In: Farrell, A.P. (Ed) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 1524–1533.
- Sachan, P., Lal, N. (2017). An overview of nickel (Ni²⁺) essentiality, toxicity and tolerance strategies in plants. *Asian Journal of Biology* 2(4), 1–15.
<https://doi.org/10.9734/AJOB/2017/33931>
- Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds). (2016). *Fish Physiology*, v. 35, *Biology of Stress in Fish*. Academic Press. 590 p.
- Seregin, I., Kozhevnikova, A.D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53(2), 257–277.
<https://doi.org/10.1134/S1021443706020178>
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of Cell Biology* 140(6), 1307–1320.
<https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1307>
- Simonato, J.D., Guedes, C.L., Martinez, C.B.R. (2008). Biochemical, physiological,

- and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.012>
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A., Carvalho, P.S.M., Melletti, P.C., Assis, H.C.S, Bianchini, A., Martinez, C.B.R. (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>
- Sun, Z., Gong, C., Ren, J., Zhang, X., Wang, G., Liu, Y., Ren, Y., Zhao, Y., Yu, Q., Wang, Y., Hou, J. (2020). Toxicity of nickel and cobalt in Japanese flounder. *Environmental Pollution* 263(B), 114516. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114516>
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., Halıcı, M.B., Şişecioğlu, M., Erol, H.S., Gergit, A. Yılmaz, B. (2015). Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiology and Biochemistry* 41(3), 625–634. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0033-1>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0297>
- Uysal, Y. (2013). Removal of chromium ions from wastewater by duckweed, *Lemna minor* L. by using a pilot system with continuous flow. *Journal of Hazardous Materials* 263, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.006>
- Vaseem, H., Banerjee, T.K. (2012). Phytoremediation of the toxic effluent generated during recovery of precious metals from polymetallic sea nodules. *International Journal of Phytoremediation* 14(5), 457–466. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.604695>
- Vaseem, H., Banerjee, T.K. (2015). Efficacy of phytoremediation technology in decontaminating the toxic effluent released during recovery of metals from

- polymetallic sea nodules. *International Aquatic Research* 7(1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0089-z>
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)
- 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, 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.011>
- Vincent, S., Sumit, R., Bavithra, S., Victoria, V., Akhila, N., Prabha, J. (2019). Metallothionein induced time dependent histomorphometric analysis of *Clarias gariepinus* exposed to cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102(1), 32–38. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2484-4>
- Vinodhini, R., Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science & Technology* 5(2), 179–182. <https://doi.org/10.1007/BF03326011>
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 122, 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10094-4](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10094-4)
- Wendelaar Bonga, S.E. (2011). Hormone Response to Stress. In: Farrell, A.P. (Ed), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, v. 2, Gas Exchange, Internal Homeostasis, and Food Uptake. Academic Press, pp. 1515–1523.
- Wood, C.M. (2011). An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *Fish Physiology*, v 31 A, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, London, pp. 1–51. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31001-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31001-1)
- Yang, J., Ma, Z. (2021). Research progress on the effects of nickel on hormone secretion in the endocrine axis and on target organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 213, 112034. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112034>

Zhang, T., Yang, M., Pan, H., Li, S., Ren, B., Ren, Z., Xing, N., Qi, L., Ren, Q., Xu, S., Song, J., Ma, J. (2017). Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin. *Chemosphere* 168, 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.119>

4. CONCLUSÃO GERAL

- A hipótese levantada neste trabalho foi parcialmente aceita, pois o acúmulo de metais e os efeitos subletais provocados pela exposição ao Cd e/ou Ni foram reduzidos ou evitados em alguns tecidos de *P. lineatus* e em outros não.
- A exposição a uma mistura binária de metais provocou alterações em um maior número de biomarcadores em relação a exposições aos mesmos metais de forma isolada. Além disso, também houve aumento da glicemia, um biomarcador que não havia se alterado nas duas exposições a um metal isolado. Desse modo, o presente estudo demonstra a importância da avaliação dos efeitos de misturas de metais, em paralelo a exposições a metais isolados.
- A concentração de metalotioneínas foi um biomarcador pouco sensível nas brânquias, apesar do acúmulo de metal nesse tecido em todas as exposições.
- Também pode-se observar que biomarcadores hematológicos foram pouco sensíveis em exposições agudas ao Cd e ao Ni. Assim, recomenda-se que futuros trabalhos com este tema avaliem preferencialmente bioacumulação e biomarcadores osmo-iônicos, que foram os mais responsivos.
- A presença de dois metais parece ter interferido na capacidade de extração de Cd e Ni pela macrófita *L. minor*. Entretanto, como foram feitas exposições separadas, não é possível afirmar que neste estudo o acúmulo de Cd e Ni foi maior nas exposições ao um metal isolado do que na exposição à mistura.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Concentração de metal nos meios de exposição

Tabela A.1 – Concentração de Cd em todos os aquários do experimento de exposição ao cádmio isolado. < LD = abaixo do limite de detecção.

			[Cd] ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
			0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito Cd	Total	Aquário 1	19,41	15,02	13,67	10,98	10,97
		Aquário 2	18,22	14,53	14,28	11,88	10,01
	Dissolvido	Aquário 1	16,05	10,87	12,85	10,45	9,51
		Aquário 2	16,78	9,06	11,81	11,29	8,14
Cd	Total	Aquário 1	20,05	19,26	21,09	18,51	19,37
		Aquário 2	19,98	16,66	18,63	18,75	16,54
	Dissolvido	Aquário 1	18,53	17,78	15,56	17,12	17,43
		Aquário 2	19,59	15,95	19,06	16,85	17,10

Tabela A.2 – Concentração de Ni em todos os aquários do experimento de exposição ao níquel isolado. < LD = abaixo do limite de detecção.

			[Ni] (mg L ⁻¹)				
			0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito Ni	Total	Aquário 1	1,45	1,47	1,43	1,25	1,18
		Aquário 2	1,46	1,21	1,42	1,23	1,15
	Dissolvido	Aquário 1	1,43	1,23	1,23	1,12	1,21
		Aquário 2	1,48	1,21	1,19	1,18	1,16
Ni	Total	Aquário 1	1,47	1,30	1,22	1,32	1,31
		Aquário 2	1,66	1,37	1,32	1,31	1,25
	Dissolvido	Aquário 1	1,49	1,16	1,20	1,15	1,28
		Aquário 2	1,50	1,25	1,08	1,27	1,27

Tabela A.3 – Concentração de Cd e Ni em todos os aquários do experimento de exposição à mistura destes dois metais.
 < LD = abaixo do limite de detecção.

			[Cd] ($\mu\text{g L}^{-1}$)					[Ni] (mg L^{-1})				
			0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito CTR	Total	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Dissolvido	Aquário 1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
		Aquário 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fito Mix	Total	Aquário 1	24,56	24,00	20,55	20,71	20,68	1,26	1,01	0,96	1,11	1,04
		Aquário 2	23,38	21,76	21,53	22,74	20,13	1,11	1,01	1,02	1,01	0,98
	Dissolvido	Aquário 1	23,54	21,04	18,64	20,78	21,74	1,21	1,06	1,00	1,05	1,06
		Aquário 2	23,65	22,29	21,53	22,74	20,67	1,17	0,92	1,00	1,01	0,99
Mix	Total	Aquário 1	24,41	21,08	23,44	22,18	20,21	1,22	1,19	1,06	1,00	1,02
		Aquário 2	24,67	21,99	23,32	23,13	22,44	1,23	1,18	1,03	1,12	1,00
	Dissolvido	Aquário 1	22,99	21,87	22,17	21,15	20,42	1,17	1,01	1,04	0,99	0,99
		Aquário 2	24,44	21,29	22,10	20,91	20,06	1,19	0,97	1,06	1,11	1,05

ANEXOS

ANEXO A

Normas de formatação

As normas para submissão de manuscritos para o periódico *Aquatic Toxicology* estão disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/aquatic-toxicology/0166-445x/guide-for-authors>

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. However, the use of full journal names is encouraged. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has page numbers.

Figures and tables embedded in text

Figures and tables can either be placed next to the relevant text in the manuscript or at the bottom (but not at the top) of the manuscript file, when all are included in a single file.