



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLA MARIA CURILAZO DIAS

A FITORREMEDIAÇÃO DA MACRÓFITA AQUÁTICA *Pistia stratiotes* PROMOVEU REDUÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE EM *Prochilodus lineatus*

Londrina
2022

GABRIELLA MARIA CURILAZO DIAS

A FITORREMEDIAÇÃO DA MACRÓFITA AQUÁTICA *Pistia stratiotes* PROMOVEU REDUÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE EM *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.

Orientador: Prof.^a Dra. Juliana Delatim Simonato

Londrina
2022

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

D541a Dias, Gabriella Maria Curilazo.
A fitorremediação da macrófita aquática *Pistia stratiotes* promoveu redução dos efeitos da exposição ao cobre em *Prochilodus lineatus*. / Gabriella Maria Curilazo Dias. - Londrina, 2022.
62 f. : il.

Orientador: Juliana Delatim Simonato.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Contaminação por metal - Tese. 2. Fitorremediação - Tese. 3. Peixe - Tese. 4. Biomarcadores bioquímicos - Tese. I. Simonato, Juliana Delatim. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

GABRIELLA MARIA CURILAZO DIAS

A FITORREMEDIAÇÃO DA MACRÓFITA AQUÁTICA *Pistia stratiotes* PROMOVEU REDUÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE EM *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

Orientador: Prof.^a Dra. Juliana Delatim
Simonato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Londrina, 13 de maio de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Juliana Delatim Simonato Rocha, pela confiança, ensinamentos, incentivos, auxílios e por acreditar em mim em todos momentos acadêmicos!

Aos membros da banca avaliadora, por contribuírem com este trabalho e com meu crescimento acadêmico e profissional e o enriquecerem com seus conhecimentos!

À prof.^a Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, pelo auxílio no desenvolvimento e nas ideias para o projeto, sempre disposta a contribuir e melhorar o trabalho!

A todos os integrantes do LEFA, que estiveram dispostos em auxiliar nos trabalhos com suas experiências, destacando Vanessa Bezerra e Mariana Lauer. Em especial ao Nicholas Alexandre Alves Pernambuco pelo desenvolvimento do projeto em conjunto, pela confiança e auxílio!

Aos membros da minha família, namorado e amigos, os quais sempre estiveram me apoiando com muito amor e paciência e proporcionaram momentos importantes ao meu desenvolvimento pessoal e acadêmico!

Agradeço a Deus que pela intercessão de Nossa Senhora me proporcionou forças e coragem para seguir meus sonhos, me guiando e protegendo durante toda a minha vida. Muito obrigada!

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

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.
Charles Chaplin

DIAS, Gabriella Maria Curilazo. **A fitorremediação da macrófita aquática *Pistia stratiotes* promoveu redução dos efeitos da exposição ao cobre em *Prochilodus lineatus***. 2022. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O cobre (Cu) é um metal essencial aos organismos aquáticos, sendo necessário para diversas funções biológicas. Contudo, quando sua concentração excede o valor necessário ao ser vivo, ele causa diversos problemas. Em rios brasileiros, o Cu já foi encontrado em diferentes concentrações, e, para analisar seus impactos, geralmente peixes são utilizados como modelo biológico. Especificamente para este estudo, o teleósteo escolhido foi o *Prochilodus lineatus* (curimba), que, assim como demais organismos, apresenta um sistema de defesa antioxidante para se proteger frente à compostos oxidantes. Para reduzir a contaminação e os efeitos tóxicos provocados por metais, existem estudos que avaliam o uso da remediação, um dos métodos é a fitorremediação, que faz o uso de plantas para remover ou imobilizar contaminantes. A macrófita *Pistia stratiotes* (alface d'água) apresenta capacidade de concentrar níveis elevados de metais em sua biomassa, e, é uma espécie de crescimento rápido com um sistema radicular bem desenvolvido. Entretanto, poucos estudos avaliaram o potencial fitorremediador em experimentos com peixes expostos a metais. Logo, o objetivo do trabalho foi analisar o potencial de *P. stratiotes* para atenuar os efeitos do cobre em juvenis do peixe dulcícola *P. lineatus*. Foram realizados dois experimentos, um de 24 horas e um de 96 horas, compostos pelos grupos controle (CTR) contendo água desclorada; controle + planta (CTRPi); cobre (Cu) contendo a concentração nominal de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu; e, cobre + planta (CuPi). Após as exposições, foram coletadas amostras de fígado, músculo e cérebro as quais foram armazenadas a -80°C até o momento das análises, também foram coletadas amostras de água de todos os aquários para analisar a concentração de Cu. As análises nos órgãos foram: atividade das enzimas glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e acetilcolinesterase (AChE), concentração de glutathione (GSH), metalotioneínas (MT) e lipoperoxidação (LPO). O primeiro resultado constatado foi a redução de 25% da mortalidade no grupo CuPi em comparação ao Cu após 96 horas de exposição. Também foi constatada uma redução da GSH nos animais expostos ao Cu, que não foi observada no grupo CuPi após 96 horas. Além disso, observou-se uma redução da concentração de Cu total na água dos aquários de 26% no experimento de 24 horas e de 35% no experimento de 96 horas. Nenhum outro efeito foi observado nas análises nos tempos experimentais. Portanto, o Cu, provocou danos letais e reduziu o conteúdo de GSH nos animais, afetando seu sistema antioxidante. E, a fitorremediação se mostrou promissora, atenuando estes efeitos, pois a *P. stratiotes* foi hiperacumuladora de metais nas raízes. Por isso, existem boas perspectivas de que este seja um método eficaz e menos custoso para o tratamento de águas contaminadas com Cu.

Palavras-chave: fitorremediação; metal; alface d'água; curimba; biomarcadores bioquímicos.

DIAS, Gabriella Maria Curilazo. **The phytoremediation of the aquatic macrophyte *Pistia stratiotes* reduced the effects of copper exposure in *Prochilodus lineatus***. 2022. 62 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential metal to aquatic organisms, necessary for numerous biological functions. However, When its concentration exceeds the required value for the organism, it causes various problems. In Brazilian rivers Cu was found in diverse concentrations, and, to analyze its impacts, fishes are generally used as biological models. Specifically for this study, the Teleostei chosen is *Prochilodus lineatus* (curimba), which, like other organisms, has an antioxidant defense system to protect themselves against oxidants. To reduce contamination and toxic effects caused by metals, some studies evaluated the use of remediation, one of its methods is the phytoremediation, which uses plants to remove or stabilize contaminants. The macrophyte *Pistia stratiotes* (water lettuce), can concentrate high levels of metals, and, it's a species of rapid growth with a well-developed radicular system. Nevertheless, few studies evaluated the phytoremediation potential in experiments on fish exposed to metals. So, the objective of this study is to analyse the potential of *P. stratiotes* to attenuate the effects of copper on juvenile exemplars of the freshwater fish *P. lineatus*. There were conducted two experiments, one of 24 hours and one of 96 hours, composed of the group: control (CTR), with dechlorinated water, control + plant (CTR_{Pi}), copper (Cu), with the nominate concentration of 15 µg L⁻¹ of Cu; and, copper + plant (Cu_{Pi}). After the exposure, samples of liver, muscle, and brain were collected and stored in a -80°C freezer until further analysis. Samples of water from each aquarium were collected to analyze the Cu concentration. The analysis conducted on the organs were: the activity of the enzymes glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e acetylcholinesterase (AChE), the concentration of glutathione (GSH), metallothionein (MT) and lipoperoxidation (LPO). The first result seen was the reduction of the mortality by 25% in the Cu_{Pi} group when compared with the Cu group after 96 hours of exposure. It was also noted a reduction of GSH in animals exposed to Cu, which was not observed in the Cu_{Pi} group after 96 hours. Besides, was found a reduction of 26% in the concentration of total Cu in the aquarium water during the 24 hours experiment and 35% during the 96 hours experiment. None Other effect was observed in the analysis at any experimental time. Therefore, Cu, promoted letal and reduced the content of GSH in the animal, affecting their antioxidant system; and phytoremediation showed as promising, attenuating these effects, because, *P. stratiotes* was a hyperaccumulator of metals on its roots. So, there are good perspectives that this is an effective and less costly method for the treatment of Cu contaminated waters.

Keywords: phytoremediation; metal; water lettuce; curimba; biochemical biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Exemplar de <i>Prochilodus lineatus</i>	11
Figura 1.2 – Mapa de distribuição do <i>Prochilodus lineatus</i> (vermelho) e <i>Pistia stratiotes</i> (amarelo) em parte da região Neotropical. *Dados coletados pela base de dados specieslink, pode ser que estas espécies estejam presentes também em outras regiões não destacadas no gráfico	12
Fig. 1.3 – Esquema das principais maneiras pelas quais se ocorre a fitorremediação	17
Figura 1.4 – Exemplar de <i>Pistia stratiotes</i>	18
Figura 4.1 – Parâmetros bioquímicos hepáticos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas a água (CTR), a água e à <i>P. stratiotes</i> (CTR <i>Pi</i>), cobre (Cu), e cobre e <i>P. stratiotes</i> (Cu <i>Pi</i>) durante 24 h e 96h. A: concentração de glutathiona reduzida (GSH); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da superóxido dismutase (SOD); D: atividade da glutathiona peroxidase (GPx); E: atividade da glutathiona-S-transferase (GST); F: nível de peroxidação tecidual (LPO); G: concentração de metalotioneínas (MT).	34
Figura 4.2 – Atividade da acetilcolinesterase em <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR), a água e à <i>P. stratiotes</i> (CTR <i>Pi</i>), cobre (Cu), e cobre e <i>P. stratiotes</i> (Cu <i>Pi</i>) durante 24 h e 96h. A: Atividade da acetilcolinesterase no cérebro; B: Atividade da acetilcolinesterase no músculo.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Controle biométrico <i>Pistia stratiotes</i> . (média \pm DP, n = 20)	27
Tabela 4.2 – Dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água monitorados durante os experimentos (média \pm DP, n = 2 aquários por dia)	28
Tabela 4.3 – Controle biométrico <i>Prochilodus lineatus</i> (média \pm DP, n = 40 – 24 h e 42 h – 96 h)	28
Tabela 4.4 – Análise da concentração de Cu na água dos aquários Grupos controle (CTR), controle com planta (CTRP); cobre (Cu) e cobre com planta (CuPi) (média \pm DP. n = 2 por tempo experimental)	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira De Normas Técnicas
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
As	Arsênio
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina
CL50	Concentração letal média para 50% dos organismos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr	Cromo
CTR	Controle
CTRPi	Controle com Planta
Cu	Cobre
CuPi	Cobre com Planta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
Erro	Espécie Reativa de Oxigênio
Fe	Ferro
GSH	Glutationa Reduzida
GSSH	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa-S-Transferase
GPx	Glutationa Peroxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
Mn	Manganês

MT	Metalotioneína
NADPH	Fosfato de Dinucleotideo de Nicotinamida e Adenina
Ni	Níquel
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OD	Oxigênio Dissolvido
Pb	Chumbo
-SH	Grupo Tiol ou Sulfrídila
SNK	Teste de Student-Newman-Keuls
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNB	Tiolato
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	7
2	INTRODUÇÃO GERAL	8
2.1	CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO.....	8
2.2	O COBRE COMO CONTAMINANTE	9
2.3	MODELO BIOLÓGICO: <i>PROCHILODUS LINEATUS</i>	11
2.4	BIOMARCADORES.....	12
2.5	EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR COBRE EM PEIXES	15
2.6	REMEDIAÇÃO AMBIENTAL.....	15
2.7	MODELO BIOLÓGICO: <i>PISTIA STRATIOTES</i>	17
2.8	A FITORREMEDIAÇÃO E OS PEIXES	18
3	OBJETIVOS E HIPÓTESE	20
4	CAPÍTULO 1. Manuscrito	21
	RESUMO	21
	ABSTRACT	22
4.1	INTRODUÇÃO	23
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.2.1	Meio de Exposição, Animal e Planta Experimentais.....	26
4.2.2	Delineamento Experimental.....	27
4.2.3	Amostragem	28
4.2.4	Homogeneização dos Tecidos	28
4.2.5	Superóxido Dismutase (SOD)	29
4.2.6	Catalase (CAT).....	29
4.2.7	Glutaciona Peroxidase (GPx).....	29
4.2.8	Glutaciona-S-Transferase (GST).....	29
4.2.9	Glutaciona (GSH)	30
4.2.10	Nível de Lipoperoxidação Tecidual (LPO)	30
4.2.11	Concentração de proteínas semelhantes à Metalotioneínas (MT)	30
4.2.12	Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no Músculo e Cérebro	31
4.2.13	Proteínas Totais no Fígado, Músculo e Cérebro	31

4.2.14	Concentração de Cu na água.....	31
4.2.15	Análise Estatística	31
4.3	RESULTADOS.....	32
4.3.1	Mortalidade.....	32
4.3.2	Parâmetros Bioquímicos.....	32
4.3.3	Atividade da Acetilcolinesterase no Cérebro e no Músculo.....	35
4.3.4	Concentração de Cu total na água	35
4.4	DISCUSSÃO	36
4.5	CONCLUSÃO	42
4.6	AGRADECIMENTOS	42
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5	CONCLUSÃO GERAL	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXO	59

1 1 APRESENTAÇÃO

2

3 Este trabalho está organizado de forma a atender às normas do Programa de
4 Pós-Graduação em Ciências Biológicas para a defesa da dissertação. O modo de
5 apresentação será no formato de artigo científico, a formatação segue as normas do
6 periódico *Ecotoxicology* (fator de impacto: 2.823). O primeiro capítulo é o manuscrito
7 gerado a partir do projeto de pesquisa desenvolvido, futuras análises e discussões
8 ainda serão acrescentadas para o artigo final. Em anexo, encontram-se as normas para
9 submissão ao periódico *Ecotoxicology*.

1 2 INTRODUÇÃO GERAL

2 2.1 Contaminação do ambiente aquático

3 A quantidade de água doce no mundo apresenta uma distribuição
4 extremamente desigual. Dentre os cinco continentes, a América sozinha apresenta
5 46% desta água, sendo que destes, 12% estão no Brasil (Brasil, 2019). Além disso,
6 grande parte dos rios e lagos estão impactados, pois sofrem com o aporte de
7 contaminantes como: agrotóxicos, efluentes de mineração, deposição de resíduos,
8 de indústrias químicas, de metalúrgicas e diversas outras (Malik et al., 2010). Essa
9 qualidade reduzida das águas compromete diretamente a saúde dos seres vivos.

10 A Constituição Federal brasileira de 1988 estabelece em seu Artigo 225 que
11 “todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum
12 do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à
13 coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras
14 gerações” (Brasil, 1988). Devido a isso, existe o CONAMA, Conselho Nacional do
15 Meio Ambiente, que por meio da portaria nº 357/2005, regulamenta a classificação
16 dos corpos d'água e padrões de lançamento de efluentes.

17 Essa classificação para as águas doces é definida em quatro categorias de
18 acordo com as características principais resumidamente citadas a seguir: a classe 1
19 abrange águas que podem ser destinadas ao consumo humano após um tratamento
20 simplificado; a classe 2, águas que podem ser destinadas ao consumo humano após
21 um tratamento convencional; a classe 3, águas que podem ser destinadas ao
22 consumo humano após um tratamento convencional ou avançado; e a classe 4
23 águas que podem ser destinadas ou à navegação ou à harmonia paisagística.
24 Nessa resolução a concentração máxima de cobre (Cu) dissolvido permitida para

1 águas doces de classe 1 e 2 é de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu e para a classe 3 é de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu
2 (Brasil, 2005).

3 Dentre os compostos tóxicos, os metais destacam-se e, apesar de serem
4 encontrados naturalmente no ambiente, podem ter suas concentrações aumentadas
5 devido a sua extração e uso. Dentre suas aplicações podemos destacar ligas
6 metálicas, confecção de ferramentas, equipamentos elétricos, na composição de
7 fertilizantes e agrotóxicos, além de diversos outros produtos (Dogan et al., 2014)

8 No ambiente aquático, os metais podem estar adsorvidos, livres na forma
9 iônica, complexados ou insolubilizados. Quando na forma iônica, eles conseguem
10 adentrar nos seres vivos e, os peixes são um dos animais mais susceptíveis. Estes
11 animais incorporam os contaminantes, principalmente, através das suas brânquias,
12 as quais tem seu epitélio alterado quando em contato com o cobre, por exemplo
13 (Sfakianakis et al., 2015; Malik et al., 2010).

14 2.2 O cobre como contaminante

15 Estudos realizados com diferentes espécies de peixes revelam que tanto os
16 metais essenciais quanto os não-essenciais podem causar efeitos tóxicos nos
17 organismos, incluindo mudanças em parâmetros bioquímicos e hematológicos, na
18 reprodução e até no crescimento (Atli e Canli 2010, Baldissera et al., 2020; Wang et
19 al., 2020).

20 O Cu é um metal essencial, isto é, imprescindível para o desempenho de
21 funções biológicas, podendo ser encontrado em enzimas e outros compostos
22 necessários ao funcionamento do organismo. Em razão disso, na sua concentração
23 “ótima”, requerida fisiologicamente para aquele organismo, não causa danos. Porém,
24 em concentrações acima desta, o Cu pode ser prejudicial (Kim et al., 2019;

1 Baldissera et al., 2020).

2 Atualmente o Cu é um dos metais mais encontrados em corpos de água (Fry
3 et al., 2020). Ele é amplamente utilizado nos setores automobilísticos, na construção
4 civil, em geradores, transformadores, fios, cabos condutores, moedas, obras de arte,
5 entre outros. Utilização esta decorrente das diversas propriedades do Cu, como boa
6 condutibilidade elétrica e térmica, resistência à corrosão e flexibilidade (Fry et al.,
7 2020). Porém, o despejo de efluentes e descartes inadequados promovem a
8 liberação deste metal para o ambiente.

9 Além disso o cobre já foi encontrado em rios brasileiros em diferentes
10 concentrações como por exemplo: $3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ nas águas do rio Camaquã próximo à
11 uma antiga mina de Cu, mesmo após 20 anos da paralização das atividades
12 mineradoras (Abril et al., 2018); $12,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ na boca do Rio Sinos, no Rio Grande do
13 Sul (Weber et al., 2013); $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu na Bacia do Rio Bacanga, no Maranhão
14 (Pinheiro-Sousa et al., 2019) e $16 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu na Bacia do Alto Rio Paraná, no Mato
15 Grosso do Sul (Viana et al., 2018); e, o valor mais alto foi encontrado no Rio Doce,
16 após o rompimento da barragem de mineração, no município de Mariana, Minas
17 Gerais, no ponto não afetado pela lama, a concentração de Cu já se mostrou
18 elevada, na concentração de $62 \mu\text{g.L}^{-1}$, no ponto a montante de um dique
19 construído para conter a lama despejada foi de $1.115 \mu\text{g.L}^{-1}$, e a concentração mais
20 exorbitante foi encontrada a jusante do dique e foi de $1427 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Carvalho et al.,
21 2017).

22 Reiterando que segundo a resolução CONAMA 357/2005 a concentração
23 máxima de cobre (Cu) dissolvido permitida para águas doces de classe 1 e 2 é de 9
24 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu e para a classe 3 é de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu (Brasil, 2005).

25

1 2.3 Modelo Biológico: *Prochilodus lineatus*

2 Os peixes são amplamente utilizados em experimentos, pela especificidade
3 de habitat requerida para sua sobrevivência e reprodução, por sua longevidade e
4 capacidade de acumular compostos tóxicos. Além disso, eles são animais de todo
5 de cadeia alimentar, sendo capazes de refletir a condição trófica do ambiente. Por
6 isso, os peixes podem auxiliar na descrição e nos estudos sobre os contaminantes
7 nos corpos aquáticos e os possíveis impactos decorrentes (Authman et al., 2015).

8 Um dos exemplos de modelo biológico sensível a alterações da qualidade
9 ambiental é o *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecido popularmente
10 como curimba ou curimbatá (Fig 1.1). Ele habita rios, lagos e reservatórios, está
11 presente em parte da região neotropical, inclusive, na bacia do Alto Rio Paraná (Fig
12 1.2). O *P. lineatus* é um peixe iliófago que se alimenta de restos orgânicos,
13 consumindo sedimentos orgânicos, inorgânicos, pequenos detritos e algas
14 (Agostinho et al., 2003).

15

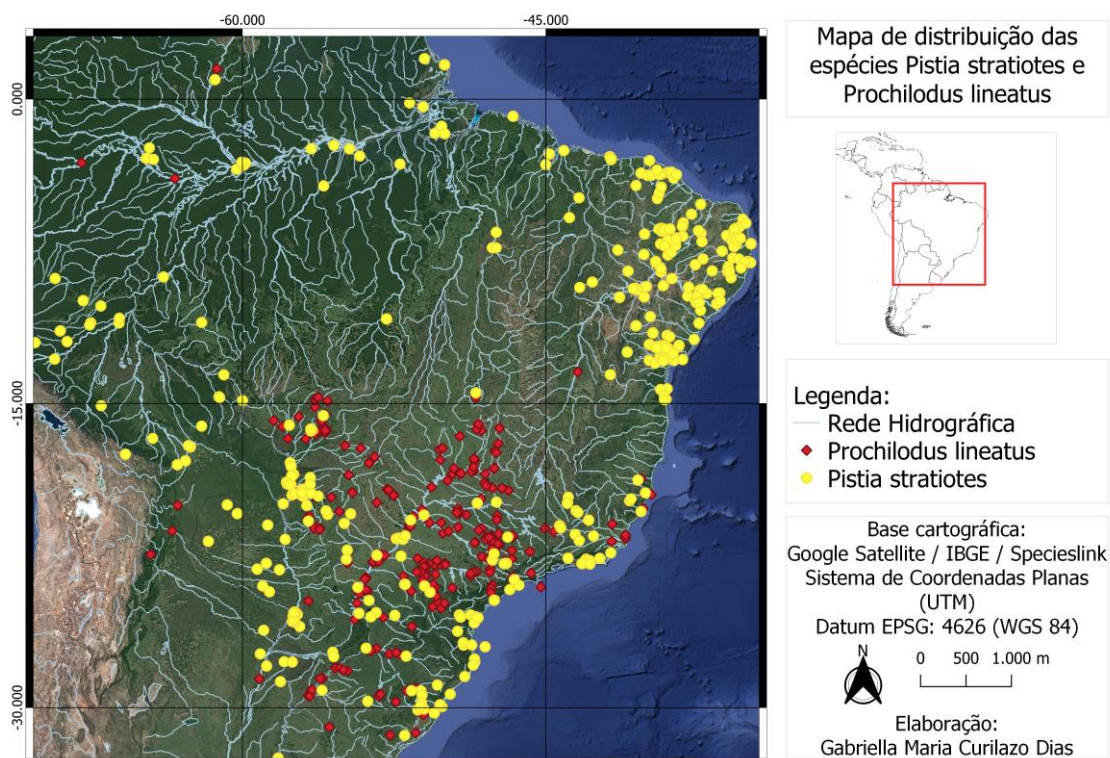


16

17 Fig 1.1 Exemplar de *Prochilodus lineatus*. Fonte: José Birindelli, 2018

18 Por todas essas características, economicamente e ecologicamente
19 importantes, *P. lineatus* já foi utilizado em vários estudos que avaliaram suas
20 reações frente a diferentes contaminantes ambientais, como microplástico (Roda et
21 al., 2020), benzo(a)pireno (Santos et al., 2018), cafeína (Santos-Silva et al., 2018),
22 inseticidas (Alvim e Martinez, 2019), e também, o foco deste estudo, o Cu (Dos

1 Santos Carvalho et al., 2015; Simonato et al., 2016; Tesser et al., 2019).



2
3 Fig 1.2 Mapa de distribuição do *Prochilodus lineatus* (vermelho) e *Pistia stratiotes* (amarelo) em parte
4 da região Neotropical. *Dados coletados pela base de dados *specieslink*, pode ser que estas espécies estejam
5 presentes também em outras regiões não destacadas no gráfico

6 2.4 Biomarcadores

7 De forma a analisar os efeitos da contaminação nos peixes, são utilizados
8 biomarcadores, que são respostas que podem ser medidas de forma experimental e
9 indicam alterações ocorridas naquele ser vivo, as quais podem ser decorrentes da
10 ação de certo agente (Amiard-Triquet et al., 2015). Os biomarcadores podem ser em
11 antioxidantes, parâmetros hematológicos, fisiológicos, histológicos, imunológicos,
12 genéticos e estruturais. Devido a isto, eles são muito importantes para indicar a
13 contaminação ambiental e as mudanças na biologia dos organismos (Amiard-Triquet
14 et al., 2015).

15 Alterações nos biomarcadores podem indicar a presença de algum agente
16 oxidante e/ou de estresse oxidativo, como, por exemplo, as espécies reativas de

1 oxigênio (ERO). Elas são produzidas pelo próprio organismo, mas sua alta
2 produção, devido à algum estressor, é capaz de desestabilizar o funcionamento das
3 células, levando a danos e até a morte dos animais. Todo composto que neutraliza
4 estes oxidantes, é denominado antioxidante, ou seja, substâncias que atrasam ou
5 previnem a oxidação de um substrato e os prejuízos que as ERO podem provocar
6 nos componentes celulares (Nikinmaa, 2014).

7 A superóxido dismutase (SOD) representa a primeira defesa antioxidante
8 contra o excesso de ERO. Esta enzima dismuta ânions superóxidos em peróxido de
9 hidrogênio (H_2O_2), molécula que posteriormente é convertida diretamente em água e
10 oxigênio pela enzima catalase (CAT) e indiretamente é utilizada como substrato pela
11 glutaciona peroxidase (GPx) para oxidação da glutaciona reduzida (GSH). A GPx,
12 além de ser doadora específica de hidrogênio para a GSH, pode ter ação
13 antioxidante sobre outros tipos de peróxidos. Por isso, é importante avaliar estas
14 moléculas, SOD, CAT e GPx, frente a exposição a um contaminante (Fadhlaoui e
15 Couture, 2016).

16 A via de defesa antioxidante trabalha de forma integrada, e em face do
17 estresse oxidativo, as células também podem aumentar a biossíntese de GSH, um
18 tri-peptídeo endógeno que pode atuar como antioxidante e prevenindo a oxidação de
19 grupos $-SH$. Além disso, a GSH indica o estado redox dos organismos pela sua
20 razão com a glutaciona oxidada (GSSH) (Amiard-Triquet et al., 2015).

21 As glutationas-S-transferase (GST) são enzimas de fase II de detoxificação,
22 isto é, catalisam a conjugação de compostos tóxicos, que apresentam átomos de
23 carbono, nitrogênio ou enxofre, ou seus metabólitos com a GSH, facilitando
24 excreção destes elementos lipofílicos e auxiliando no balanço redox. Também
25 podem ter ação antioxidante em produtos resultantes da lipoperoxidação (LPO).

1 Todas as defesas supracitadas previnem danos nos componentes celulares, porém
2 essa ação pode variar de acordo com o tipo celular e na presença de um
3 contaminante (Nikinmaa, 2014).

4 Se as ERO não forem neutralizadas, podem promover danos e até morte
5 celular por provocar o estabelecimento de estresse oxidativo. Um tipo de dano
6 provocado nesta situação é a peroxidação lipídica (LPO), que é uma cadeia de
7 reações cujos oxidantes causam danos nos fosfolípidos da membrana levando
8 diminuição da sua fluidez e disfunção da integridade fosfolipídica (Amiard-Triquet et
9 al., 2015).

10 Os contaminantes, após incorporados, podem ser mantidos ou excretados do
11 tecido. No caso dos peixes, os mecanismos de defesa contra os metais geralmente
12 são eficientes, o que pode estar diretamente relacionado com a ação das
13 metalotioneínas (MT). Estas proteínas são capazes de “sequestrar” o metal das
14 células, pela presença de grupos tióis, os quais neutralizam a ação de alguns íons e
15 agem na detoxificação do organismo. O aumento da concentração de
16 metalotioneínas é induzido logo após a exposição a metais essenciais (Le Croizier et
17 al., 2018).

18 Além dessas moléculas, outras também podem ser utilizadas como
19 biomarcadores da contaminação por metais. Como por exemplo, a
20 acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina
21 (ACh) em acetato e colina na fenda sináptica, ação que permite a finalização da
22 transmissão sináptica. A ACh é um neurotransmissor que auxilia na transmissão de
23 impulsos elétricos entre células nervosas e entre neurônios e células musculares
24 (Houghton et al., 2006). Muitos contaminantes podem inibir a ação da AChE,
25 aumentando assim a quantidade de ACh na fenda sináptica, causando continuidade

1 da resposta sináptica (Silva et. al., 2013).

2 2.5 Efeito da contaminação por cobre em peixes

3 A toxicidade do Cu para peixes é bem definida na literatura. Estudos com o
4 modelo biológico *P. lineatus* puderam comprovar indução de MT, aumento da
5 atividade da GST, SOD, GPx, aumento da LPO e redução da atividade da CAT nas
6 brânquias dos peixes expostos ao Cu em concentrações de 24,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (pH 4,5) e 4
7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (pH 8) durante 96 horas (Dos Santos Carvalho et al., 2015).

8 Também foram observados redução da atividade da AChE no músculo e
9 aumento da LPO e das MT no fígado, nas exposições de 5, 9 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu no
10 tempo de exposição de 96 horas (Simonato et al., 2016).

11 Tesser et al. (2019) após um tempo de 96 horas observaram um aumento da
12 LPO no fígado, danos histológicos e inibição da H^+ e Ca^{2+} -ATPases nas brânquias
13 em peixes expostos a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. Roda et al. (2020), também após 96 horas
14 relataram redução da LPO e da GSH no fígado, além da redução da atividade da
15 AChE no cérebro na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

16 2.6 Remediação ambiental

17 De forma a diminuir a contaminação por metais enfrentada por tantos países,
18 tanto do solo quanto da água, alguns estudos avaliam o potencial remediador de
19 diversos elementos, compostos e/ou organismos. Para a retirada do Cu dos esgotos,
20 vários métodos são utilizados: precipitação química, quelação/complexação, troca de
21 íons, filtração por membrana, flotação, tratamentos eletroquímicos,
22 coagulação/floculação e a bioadsorção (Bilal et al., 2013). Outras maneiras de
23 remediação do Cu na água são a aplicação de nanopartículas magnéticas de óxido

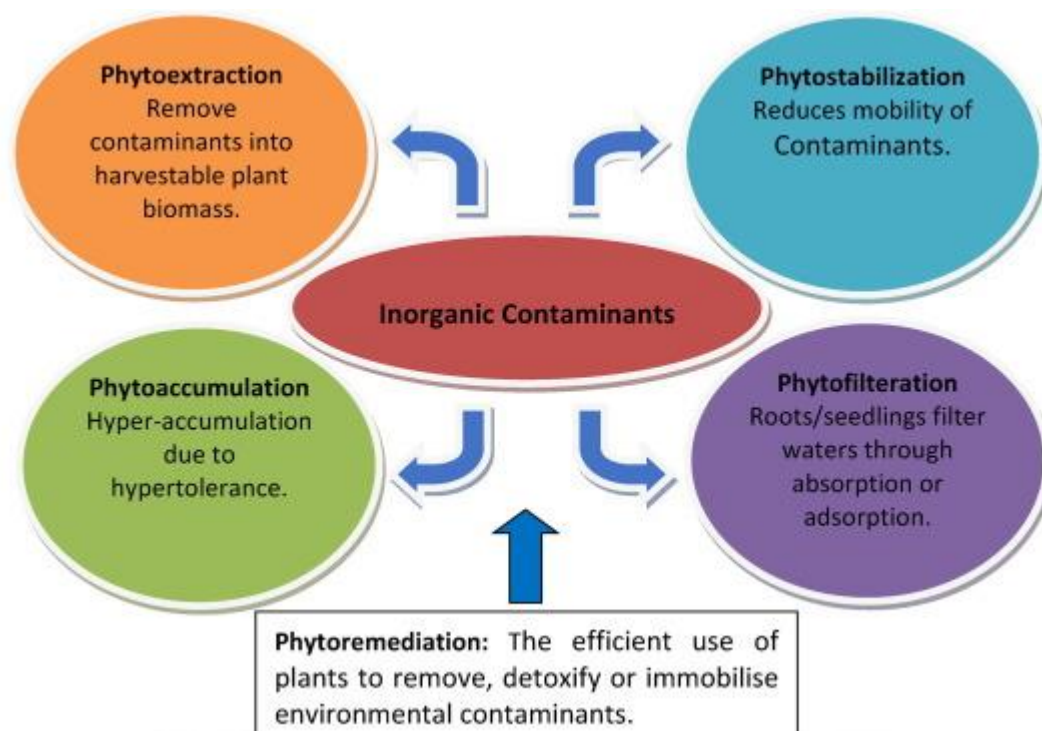
1 de ferro (Leonel et al., 2020), restauração de áreas degradadas pela urbanização
2 (Hu, 2020) e via imobilização covalente do ácido fólico com nanosílica clorada
3 (Mahmoud et al., 2019). Porém a maioria destas abordagens é muito cara para ser
4 desenvolvida, operada e mantida. Por isso, é necessário que técnicas mais simples,
5 menos custosas e eficientes sejam estudadas (Vitas et al., 2018).

6 A fitorremediação, segundo a resolução CONAMA N°463/2014, utiliza
7 vegetais com a finalidade de remover, imobilizar ou reduzir o potencial de
8 contaminantes orgânicos e inorgânicos, sendo uma técnica na qual as plantas são
9 capazes de extrair, transferir, acumular e/ou estabilizar diversos metais (Afonso et
10 al., 2020, Brasil, 2014). Além disso, é um método menos custoso e menos danoso
11 ao meio ambiente, em comparação a outras maneiras de remediação (Alikasturi et
12 al., 2019).

13 Existem diversos mecanismos pelos quais as plantas aquáticas podem
14 realizar a fitorremediação. Na fitoestabilização, os contaminantes são imobilizados
15 pela adsorção ou acúmulo nas raízes ou ainda precipitação no interior da zona da
16 raiz. Na rizofiltração, as raízes adsorvem ou absorvem os contaminantes por
17 precipitação ou sequestro. A fitodegradação envolve a degradação dos
18 contaminantes por processos metabólicos da planta, ação enzimática e oxidação
19 fotossintética que hidrolisa os compostos em pequenas unidades. A fitoextração é o
20 processo de translocação ou absorção dos contaminantes pelo broto da planta. Na
21 fitoacumulação ocorre o estoque de contaminantes pelos tecidos da planta, através
22 do transporte pelo xilema, de modo que os poluentes permanecem no vacúolo, onde
23 são convertidos em formas não tóxicas. E por fim, a fitovolatilização, relacionada à
24 remoção dos contaminantes acumulados nas folhas através do processo de
25 transpiração. Para que a volatilização ocorra, os contaminantes são transformados

1 em compostos solúveis em água e não tóxicos (Jeevanantham et al., 2019).

2 Assim, para tentar conter a contaminação e por consequência reduzir os
 3 efeitos tóxicos dos contaminantes, muitos estudos buscam avaliar o potencial de
 4 plantas como remediadoras ambientais. Por ser um dos macronutrientes
 5 necessários às plantas, em ambientes aquáticos contaminados com Cu, algumas
 6 plantas se mostraram eficientes em removê-lo da água como a *Myriophyllum*
 7 *aquaticum* (Guo et al., 2020), *Limnocharis flava* (Alikasturi et al., 2019), *Lemna minor*
 8 e *Salvinia auriculata* (Panfili et al., 2017) e *Pistia stratiotes* (Putra et al., 2015; Galal e
 9 Farahat, 2015; Lakra et al., 2019).



10 Fig. 1.3 Esquema das principais maneiras pelas quais se ocorre a fitorremediação. Fonte: Ansari et
 11 al., 2020
 12

13 2.7 Modelo biológico: *Pistia stratiotes*

14 *Pistia stratiotes* (alface d'água) (Figura 1.3) é um exemplo de macrófita
 15 aquática, presente em toda a região tropical, sendo encontrada em todo o Brasil (Fig
 16 1.3). É uma planta da família Araceae, bem resistente a diferentes condições da
 17 água, podendo estar na água doce pura, poluída, lamacenta ou em água parada

1 (Vieira et al., 2019).

2

3

4

5

6

7

8



9 Fig 1.4 Exemplar de *Pistia stratiotes*. Fonte: Google Imagens

10

11 A *P. stratiotes* apresenta capacidade de concentrar níveis elevados de metais
12 em sua biomassa, que seriam fitotóxicos a outras espécies cultivadas sob condições
13 semelhantes (Romeiro et al., 2007), além disso é uma espécie de crescimento
14 rápido e têm um sistema radicular bem desenvolvido; todas estas características a
15 conferem o caráter de uma hiperacumuladora de metal (Qian et al., 1999).

16 A tolerância da macrófita ao estresse gerado pela contaminação inclui vários
17 ajustes metabólicos, incluindo a ativação da detoxificação e do sistema de defesa
18 antioxidante e meios metabólicos de proteção; para que, dessa forma, a planta
19 consiga reestabelecer o seu balanço metabólico (Li et al., 2022).

20 Além disso, esta planta aquática, já se mostrou eficaz em acumular diferentes
21 metais sem sofrer grandes danos, reduzindo a quantidade destes na água. São
22 exemplos, a remoção de Cu e Pb, (Putra et al., 2015); de Mn, Cd, Cu e Ni (Galal e
23 Farahat, 2015); e de Fe, Mn, Ni, Zn, Cu, Pb, Cr e Cd (Lakra et al., 2019).

24 2.8 A fitorremediação e os peixes

25 Na literatura, poucos estudos avaliaram a fitorremediação em experimentos

1 com peixes expostos a metais. Um desses poucos trabalhos concluiu que o
2 processo de fitorremediação com *Eichhornia crassipes* diminuiu o acúmulo de Cu em
3 vários órgãos e atenuou a atividade da SOD, CAT e GPx nos tecidos de *Clarias*
4 *batrachus*, após exposição ao Cu (5 e 10 mg L⁻¹) durante 21 dias (Goswami e Das,
5 2018). Em outro estudo, a fitorremediação com *P. stratiotes* e *E. crassipes* se
6 mostrou eficaz reduzindo a concentração de Cd, Zn, Cu e Cr na água e,
7 conseqüentemente, manteve os peixes (*Sarotherodon melanotheron*) vivos por mais
8 tempo expostos aos metais à sua CL50 (Victor et al., 2016). As plantas *L. minor* e
9 *Azolla pinnata* também mostraram eficiência na recuperação de macromoléculas e
10 na redução do acúmulo nos tecidos do peixe *Labeo rohita*, após exposição aos
11 metais Mn, Zn, Cu e Fe (Vaseem e Banerjee, 2015).

12 Logo, estudos associando a fitorremediação com *P. stratiotes* e *P. lineatus*
13 são relevantes para compreensão e conseqüente melhoria da qualidade de vida
14 destes peixes em ambientes contaminados com Cu.

15

16

1 3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2

3 Analisar o potencial de *P. stratiotes* (alface d'água) para atenuar os efeitos
4 do cobre em juvenis do peixe dulcícola *P. lineatus* (curimba).

5 Os objetivos específicos são:

- 6 • Investigar se a fitorremediação é eficiente para reduzir possíveis efeitos do Cu
7 ($15 \mu\text{g L}^{-1}$) em parâmetros bioquímicos nos peixes expostos;
- 8 • Fornecer dados que possam contribuir para a conservação, proteção e
9 possível fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados pelo cobre.

10 Em razão disso, a hipótese deste estudo é que a *P. Stratiotes* será capaz de
11 promover a redução de efeitos letais e subletais promovidos pelo Cu nos exemplares
12 de *P. lineatus*.

13

4 CAPÍTULO 1. MANUSCRITO

RESUMO

A fitorremediação, método que utiliza plantas para remover ou imobilizar contaminantes, pode ser utilizada em ambientes contaminados com cobre (Cu). Entretanto, poucos estudos avaliaram o potencial fitorremediador em experimentos com peixes expostos a metais. Logo, o objetivo do trabalho foi analisar o potencial de *Pistia stratiotes* para atenuar os efeitos do cobre em juvenis do peixe dulcícola *Prochilodus lineatus*. Foram realizados dois experimentos (24 e 96 horas), compostos pelos grupos controle (CTR) contendo água desclorada; controle + planta (CTRPI); cobre (Cu) contendo a concentração nominal de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu; e, cobre + planta (CuPi). Após as exposições, foram coletadas amostras de fígado, músculo e cérebro, também foram coletadas amostras de água para analisar a concentração de Cu. As análises nos órgãos foram: atividade das enzimas glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e acetilcolinesterase (AChE), concentração de glutathione (GSH), metalotioneínas (MT) e lipoperoxidação (LPO). Constatou-se uma redução de 25% da mortalidade e, uma redução da GSH no grupo CuPi em comparação ao Cu após 96 horas de exposição. Além disso, houve redução da concentração de Cu na água, 26% após 24 horas e de 35% após 96 horas. Portanto, o Cu, provocou danos letais e reduziu o conteúdo de GSH nos animais, e a fitorremediação se mostrou promissora, pois a *P. stratiotes* se mostrou como hiperacumuladora de metais nas raízes. Por isso, existem boas perspectivas de que este seja um método eficaz e menos custoso para o tratamento de águas contaminadas com Cu.

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

ABSTRACT

Phytoremediation is a method that uses plants to remove or immobilize contaminants, and, it can be used in copper (Cu) contaminated places. However few studies evaluated the phytoremediator potential in experiments of fish exposed to metals. Thus, the objective of this study was to evaluate the *Pistia stratiotes* potential to attenuate copper effects on juvenile freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Two experiments were conducted (24 and 96 hours), composed by the groups control (CTR), with dechlorinated water, control + plant (CTRPi), copper (Cu), with the nominal concentration of 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cu; and copper + plant (CuPi). After the exposure liver, muscle, and brain samples were collected, also water samples to analyse the Cu concentration. The analysis conducted on the organs were: activity of the enzymes glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and acetylcholinesterase (AChE), concentration of glutathione (GSH), metallothionein (MT) and lipoperoxidation (LPO). It was observed a 25% reduction in mortality and a reduction of GSH in group CuPi in comparison to Cu after 96 hours of exposure. Besides, there was a reduction of 26% in the concentration of total Cu in the water during the 24 hours experiment and 35% in the 96 hours. Therefore, Cu promoted letal and reduced the content of GSH in the animal; and phytoremediation showed promising, because, *P. stratiotes* was a hyperaccumulator of metals on its roots. So, there are good perspectives that this is an effective and less costly method for the treatment of Cu contaminated waters.

Keywords: Phytoremediation; Metal; Water lettuce; Curimba; Biochemical biomarkers.

4.1 Introdução

O cobre (Cu) é um metal essencial aos organismos aquáticos, sendo necessário para diversas funções biológicas. Contudo, quando sua concentração excede o valor necessário ao ser vivo, ele causa diversos problemas (Baldissera et al., 2020; Kim et al., 2019). Este metal é muito utilizado nos setores automobilísticos, na construção civil, em geradores, transformadores, fios, cabos condutores, moedas, obras de arte, entre outros; devido às suas diversas propriedades como, boa condutibilidade elétrica e térmica, resistência à corrosão e flexibilidade (Fry et al., 2020). No entanto, descartes inadequados e despejo de efluentes promovem a liberação deste metal para o ambiente.

No Brasil o Cu já foi encontrado em rios em diferentes concentrações como por exemplo: $3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ nas águas do rio Camaquã próximo à uma antiga mina de Cu, mesmo após 20 anos da paralização das atividades mineradoras (Abril et al., 2018); $12,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ na boca do Rio Sinos, no Rio Grande do Sul (Weber et al., 2013); $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu na Bacia do Rio Bacanga, no Maranhão (Pinheiro-Sousa et al., 2019) e $16 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu na Bacia do Alto Rio Paraná, no Mato Grosso do Sul (Viana et al., 2018); e, o valor mais alto foi encontrado no Rio Doce, após o rompimento da barragem de mineração, no município de Mariana, Minas Gerais, no ponto não afetado pela lama, a concentração de Cu já se mostrou elevada, na concentração de $62 \mu\text{g.L}^{-1}$, no ponto a montante de um dique construído para conter a lama despejada, foi de $1.115 \mu\text{g.L}^{-1}$, e a concentração mais exorbitante foi encontrada a jusante do dique, sendo de $1427 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Carvalho et al., 2017).

Sendo que, segundo a resolução CONAMA 357/2005 a concentração máxima de cobre (Cu) dissolvido permitida para águas doces de classe 1 e 2 é de $9 \mu\text{g L}^{-1}$

Cu e para a classe 3 é de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu (Brasil, 2005).

Os peixes são muito utilizados em estudos de possíveis impactos de poluentes no ambiente aquático, devido a sua especificidade de habitat, longevidade, capacidade de acumular compostos, e modo de alimentação (Authman et al., 2015). O modelo biológico deste estudo é o *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente conhecido como curimba ou curimbatá, um peixe neotropical iliófago (Agostinho et al., 2003). Por ser economicamente e ecologicamente importante, este modelo já foi utilizado em vários estudos que avaliaram suas reações frente a diferentes contaminantes ambientais.

Para se proteger dos danos frente a contaminação, os peixes, assim como os demais organismos, apresentam um sistema de defesa antioxidante que inclui diversas enzimas como a glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa redutase (GR), e também compostos não enzimáticos como a glutationa (GSH), vitamina E e a vitamina C. Existem também as metalotioneínas (MT), proteínas que pela presença de grupos tióis bloqueiam a ação de íons metálicos e também agem na detoxificação. Se estas defesas não funcionarem podem ocorrer danos e até morte celular por provocar o estabelecimento de estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica (LPO) (Javed et al., 2020; Diaz-de-Alba et al., 2017). Também há a acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) em acetato e colina na fenda sináptica, ação que permite a finalização da transmissão sináptica, muitos contaminantes podem inibir sua ação da causando continuidade da resposta sináptica (Silva et. al., 2013).

Os efeitos subletais do Cu em *P. lineatus* incluem indução de MT, aumento da atividade da GST, SOD, GPx, aumento da LPO e redução da atividade da CAT

nas brânquias, em peixes expostos às concentrações de 24,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (pH 4,5) e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Ph 8) (Dos Santos Carvalho et al., 2015). Também foi observado redução da atividade da AchE no músculo e aumento da LPO e das MT no fígado, em exposições de 5, 9 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu (Simonato et al., 2016). Tesser et al. (2019) observaram um aumento da LPO no fígado, em peixes expostos a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. Roda et al. (2020) relataram redução da LPO e da GSH no fígado, além da redução da atividade da AChE no cérebro na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para reduzir a contaminação e os efeitos tóxicos provocados por metais, existem estudos que avaliam o uso da remediação. Um dos métodos utilizados é a fitorremediação, técnica que faz o uso de plantas para remover ou imobilizar contaminantes, sendo capaz de extrair, transferir, acumular e/ou estabilizar diversos metais (Afonso et al., 2020; Brasil, 2014).

A macrófita *Pistia stratiotes* (alface d'água) apresenta capacidade de concentrar níveis elevados de metais em sua biomassa, que seriam fitotóxicos a outras espécies cultivadas sob condições semelhantes (Romeiro et al., 2007), além disso é uma espécie de crescimento rápido e têm um sistema radicular bem desenvolvido; todas estas características a conferem o caráter de uma hiperacumuladora de metal (Qian et al., 1999).

Este modelo biológico já foi capaz de reduzir a quantidade de metais na água. São exemplos estudos com Cu e Pb (Putra et al., 2015); Mn, Cd, Cu e Ni (Galal e Farahat, 2015); Fe, Mn, Ni, Zn, Cu, Pb, Cr e Cd (Lakra et al., 2019).

Entretanto, poucos estudos já avaliaram o potencial fitorremediador de plantas em experimentos com peixes expostos a metais. Um desses trabalhos concluiu que o processo de fitorremediação com *Eichhornia crassipes* diminuiu o acúmulo de Cu em vários órgãos e atenuou o aumento da concentração da SOD,

CAT e GPx nos tecidos de *Clarias batrachus*, após exposição ao Cu (5 e 10 mg L⁻¹), protegendo estes peixes da exposição ao contaminante (Goswami e Das, 2018). Em outro estudo, a fitorremediação com *P. stratiotes* e *E. crassipes* se mostrou eficaz, reduzindo a concentração de Cd, Zn, Cu e Cr na água e, conseqüentemente, aumentou o tempo de sobrevivência de *Sarotherodon melanotheron* expostos aos metais na sua CL50 (Victor et al., 2016). As plantas *Lemna minor* e *Azolla pinnata* também mostraram eficiência na recuperação de macromoléculas e no acúmulo nos tecidos do peixe *Labeo rohita* após exposição aos metais Mn, Zn, Cu e Fe (Vaseem e Banerjee, 2015).

Logo, estudos sobre a fitorremediação com *P. stratiotes* são necessários para melhorar o entendimento desta técnica e assim, fornecer mais informações para projetos que visam a qualidade de vida do modelo biológico *P. lineatus* em ambientes contaminados com Cu. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar o potencial de *P. stratiotes* (alface d'água) para atenuar os efeitos do cobre em juvenis do peixe dulcícola *P. lineatus* (curimba).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Meio de Exposição, Animal e Planta Experimentais

O meio de exposição foi preparado com o uso de 15 µg L⁻¹ Cu, advindo do Cloreto de Cobre adquirido comercialmente (marca do cobre). Esta concentração foi baseada concentrações detectadas em estudos prévios e próxima aos valores presentes na resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) para o Cu dissolvido em rios de classe 3 (13 µg L⁻¹).

Os exemplares de *P. Stratiotes* e *P. lineatus* foram adquiridos comercialmente. Tanto as plantas quanto os peixes passaram por uma aclimação durante 7 dias, com renovação da água a cada 48 h, em ambientes separados. Os animais foram aclimatados em tanques de 300 L, contendo água desclorada e aeração constante, sendo alimentados com ração Guabi® a cada 48 horas, com temperatura e fotoperíodo controlado de 12h claro e 12h escuro. Antes da realização do experimento foram realizadas medidas e pesagem nas macrófitas a fim de padronizá-las para o experimento (Tabela 4.1). Todos os procedimentos realizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina – CEUA sob nº 001/2021.

Tabela 4.1– Controle biométrico *Pistia stratiotes* (Média ± DP).

Tempo	n	Peso (g)	Diâmetro (cm)	Número de folhas	Raíz (cm)
24 h	20	17,45 ± 0,07	13,88 ± 0.39	8,3 ± 1,13	5
96 h	20	29,3 ± 4,1	14,01 ± 0.49	7,7 ± 0,042	5

4.2.2 Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados em aquários de vidro de 10 L, com água livre de cloro e aeração constante. Foram realizados 2 experimentos com 40 aquários cada. Cada tempo experimental, 24 e 96 horas, era composto por 4 grupos com 10 aquários cada; o primeiro era o grupo controle (CTR) contendo água desclorada e 1 exemplar de peixe por aquário; o segundo, o grupo controle com planta (CTR_{Pi}), contendo água desclorada, 1 exemplar de peixe e 1 exemplar de planta por aquário; o terceiro, o grupo (Cu) contendo a concentração nominal de 15 µg L⁻¹ de Cu e 1 exemplar de peixe por aquário; por fim, o grupo cobre com planta (Cu_{Pi}) contendo a concentração nominal de 15 µg L⁻¹ de Cu, 1 exemplar de peixe e 1 exemplar de planta por aquário. Devido à mortalidade ocorrida nos grupos

experimentais Cu e CuPi em 96 horas, foi realizado adicionalmente um terceiro experimento contendo apenas estes grupos, nos mesmos moldes dos experimentos anteriores.

Durante os experimentos foram monitorados dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água monitorados durante os experimentos (média \pm DP. n = 24h - 4; 96h - 8).

Tempo	Temperatura	pH	Oxigênio (mg⁻¹ L.OD)	Condutividade (mS⁻¹ cm)
24 h	22,28 \pm 0,07 °C	7,91 \pm 0.16	6,17 \pm 0.35	0,107 \pm 0,003
96 h	22,88 \pm 0,05 °C	7,85 \pm 0.24	6,58 \pm 0.27	0,115 \pm 0,006

4.2.3 Amostragem

Após o período de exposição, os animais foram retirados dos aquários e imediatamente anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹), foram medidos e pesados para controle biométrico (Tabela 4.3). Os peixes foram mortos por secção medular para a coleta dos seguintes órgãos: fígado, cérebro e músculo, os quais foram congelados a -70°C até o momento das análises bioquímicas. Após a exposição, as plantas também foram coletadas e armazenadas em freezer -20°C.

Tabela 4.3 – Controle biométrico *Prochilodus lineatus* (média \pm DP).

Tempo	n	Peso (g)	Comprimento padrão (cm)	Comprimento total (cm)
24 h	40	64,9 \pm 2,81	14,55 \pm 0.24	18,21 \pm 0,25
96 h	42	67,65 \pm 4,57	14,71 \pm 0.24	18,46 \pm 0,22

4.2.4 Homogeneização dos Tecidos

Para as análises bioquímicas: SOD, CAT, GPx, GSH, GST, LPO, o fígado foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7,0). Para a análise da atividade da enzima AChE, o cérebro e o músculo também foram homogeneizados

em tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7,5).

Para a análise da concentração de MT, o fígado foi homogeneizado com um tampão Tris-Sacarose (pH 8,6) contendo inibidores de proteases (PMSF e β -mercaptaetanol).

4.2.5 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi estimada pela taxa de redução do citocromo *c* inibida pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), resultante da oxidação da xantina pela xantina oxidase, em 550 nm e expressa em U de SOD mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo *c* (Mccord e Fridovich, 1969).

4.2.6 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada através da velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, onde foi avaliado o decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975) e essa atividade foi expressa em $\mu\text{mol de } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

4.2.7 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada através da oxidação do NADPH em presença de H_2O_2 , em espectrofotômetro em 340 nm e expressa em $\mu\text{mol de NADPH oxidado minuto por mg de proteína}^{-1}$ (Hopkins e Tudhope, 1973).

4.2.8 Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi estimada através da complexação do tripeptídeo

glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em espectrofotômetro, a 340 nm, de acordo com Keen et al. (1976). A atividade foi expressa em nmol CDNB conjugado min^{-1} mg de proteína⁻¹.

4.2.9 Glutathiona (GSH)

A concentração de glutathiona (GSH) foi determinada pelo método descrito por Beutler et al. (1963). A reação da glutathiona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) produz o tiolato (TNB), que foi quantificado em espectrofotômetro, a 412 nm. O resultado foi expresso em μg de -SH mg de proteína⁻¹.

4.2.10 Nível de Lipoperoxidação Tecidual (LPO)

A concentração de LPO foi determinada pela quantificação do malondialdeído (MDA), que é um dos produtos da peroxidação lipídica, a partir do ensaio TBARS, que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), em espectrofotômetro de fluorescência a ex/em: 535/590 nm (Camejo et al., 1998) A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA como nmol de MDA por mg de proteína⁻¹.

4.2.11 Concentração de proteínas semelhantes à Metalotioneínas (MT)

A concentração de MT foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Viarengo et al. (1997). Os grupos sulfidril (-SH) foram quantificados em espectrofotômetro a 412 nm, usando reagente de Ellman. A GSH foi utilizada como padrão e o conteúdo de MT está expresso em μg -SH por mg de proteína⁻¹.

4.2.12 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no Músculo e Cérebro

A atividade da AChE foi determinada no músculo e no cérebro, a partir da reação do iodeto de acetilcolina (substrato da enzima) com o ditionitrobenzoato (DTNB), em leitora de microplacas em 415 nm, (Ellman et al., 1961 adaptado por Alves-Costa et al. 2007), e expressa em $\text{nmol. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína.

4.2.13 Proteínas Totais no Fígado, Músculo e Cérebro

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

4.2.14 Concentração de Cu na água

A água foi coletada dos aquários diariamente e, a fim de estabilizar a concentração do metal foi acrescentado a ela HNO_3 na proporção de 230 μL de ácido para 15 mL de água para obter uma concentração final de 1% de HNO_3 . Então foi armazenada a -20°C para posterior análise.

A análise de Cu total na água foi realizada pelo método de curva de calibração (10, 20, 30 e 50 $\mu\text{g/L}$) utilizando o comprimento de onda 450 nm em espectrofotômetro.

4.2.15 Análise Estatística

Os resultados foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade de variância. Quando os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, testes paramétricos foram empregados (ANOVA para um fator e

SNK). Caso contrário, os dados foram analisados através de testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e teste de Dunn). Foi adotado um nível de significância de 5%. Os resultados foram comparados entre os grupos para cada um dos parâmetros (CTR x CTRPi x Cu x CuPi) para cada um dos tempos experimentais. Os resultados obtidos com os dois experimentos de 96 horas foram considerados em conjunto para a análise estatística.

4.3 Resultados

4.3.1 Mortalidade

Durante o experimento de 24 horas não houve mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, no primeiro experimento de 96 horas, no grupo Cu houve a mortalidade de 7 espécimes e no grupo CuPi de 4 espécimes, portanto, de modo a atingir valores mínimos para análise estatística foi realizado outro experimento, neste, houve a mortalidade de 4 exemplares do grupo Cu e de 2 do grupo CuPi. Totalizando, no experimento de 96 horas, mortalidade de 55% no grupo Cu e de 30% do CuPi.

4.3.2 Parâmetros Bioquímicos

Os peixes expostos ao Cu decorridas 24 horas não sofreram alterações significativas no conteúdo de GSH no fígado, porém uma tendência de redução foi observada no grupo Cu ($p=0,083$) (Fig 4.1A). No entanto, após 96 horas, o grupo exposto ao Cu teve sua concentração reduzida em comparação aos outros grupos. Não foram observadas diferenças significativas nas atividades das enzimas CAT, SOD, GPx e GST e nem nos níveis de LPO (Fig 4.1B-F) no fígado, além de

nenhuma alteração nas MT no fígado (Fig 4.1G) nos animais experimentais durante 24 ou 96 horas.

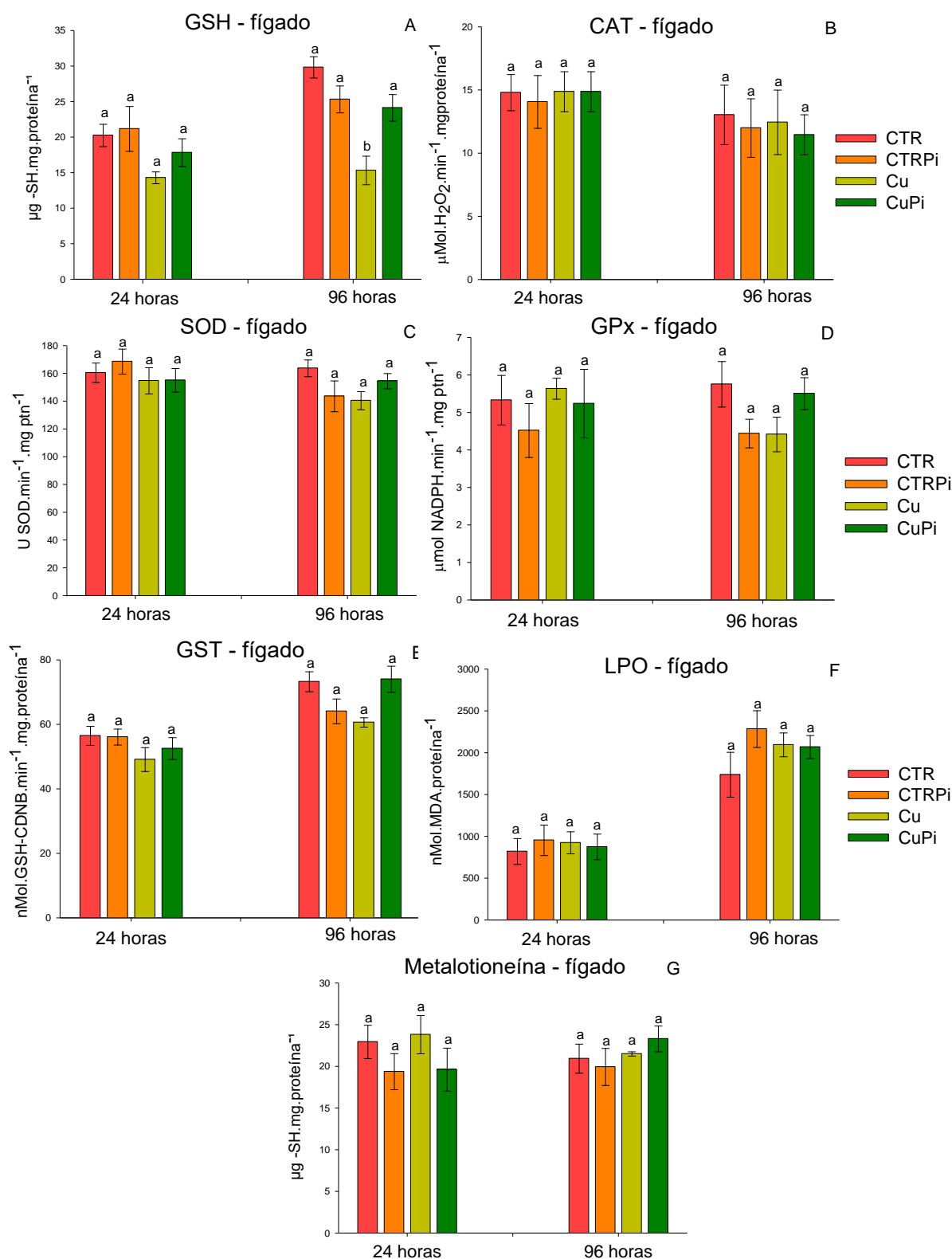


Fig 4.1 Parâmetros bioquímicos hepáticos de *P. lineatus* expostos apenas a água (CTR), a água e à *P. stratiotes* (CTRPi), cobre (Cu), e cobre e *P. stratiotes* (CuPi) durante 24 h e 96h. A: concentração de glutatona reduzida (GSH); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da superóxido dismutase (SOD); D: atividade da glutatona peroxidase (GPx); E: atividade da glutatona-S-transferase (GST); F: nível de peroxidação lipídica (LPO); G: concentração de metalotioneínas (MT). As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. Grupos do experimento de 24 horas (n = 10); Grupos CTR e CTRPi de 96 h (n = 10); Grupo Cu de 96 h (n = 9); e Grupo CuPi de 96 h (n = 14). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

4.3.3 Atividade da Acetilcolinesterase no Cérebro e no Músculo

A atividade da enzima acetilcolinesterase não sofreu mudanças significativas quanto comparados os grupos controle aos grupos com Cu, seja eles com exemplares de plantas ou não, durante os dois tempos de exposição no cérebro (Fig 4.2A) e no músculo (Fig 4.2B).

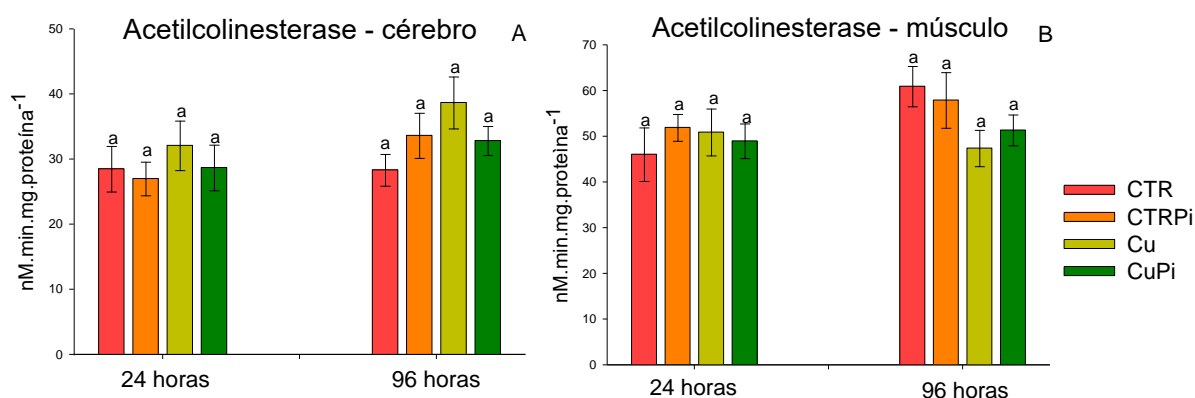


Fig 4.2 – Atividade da acetilcolinesterase em *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR), a água e à *P. stratiotes* (CTRPi), cobre (Cu), e cobre e *P. stratiotes* (CuPi) durante 24 h e 96h. A: Atividade da acetilcolinesterase no cérebro; B: Atividade da acetilcolinesterase no músculo. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão. Grupos do experimento de 24 horas (n = 10); Grupos CTR e CTRPi de 96 h (n = 10); Grupo Cu de 96 h (n = 9); e Grupo CuPi de 96 h (n = 14). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

4.3.4 Concentração de Cu total na água

No experimento de 24 horas, entre o grupo Cu, nos dois tempos, através do desvio padrão consideramos os dois valores iguais. Entre o grupo CuPi, houve uma redução de 26% na concentração de cobre no tempo de 24 horas em comparação ao tempo 0.

No entanto, no experimento de 96 horas, entre os grupos Cu, nos tempos de 24 e 48 horas, através do desvio padrão consideramos os dois valores iguais. No entanto houve uma redução de 37% da concentração deste metal quando

comparamos o tempo final com o inicial. Entre o grupo CuPi, houve uma redução de 35% na concentração de cobre no tempo de 48 horas em relação ao tempo 0. Já nos tempos 48 e 96 a concentração se manteve semelhante estatisticamente.

Tabela 4.4 – Análise da concentração de Cu na água dos aquários Grupos controle (CTR), controle com planta (CTRPi); cobre (Cu) e cobre com planta (CuPi) (média \pm DP. n = 2 por tempo experimental)

Experimento 24 horas		
	Grupo	Média
Tempo 0 h	CTR	2,55 \pm 0,94
	CTRPi	0,82 \pm 0,48
	Cu	9,49 \pm 1,16
	CuPi	7,93 \pm 0,62
Tempo 24 h	CTR	3,55 \pm 1,78
	CTRPi	2,83 \pm 1,44
	Cu	10,41 \pm 1,65
	CuPi	5,86 \pm 0,79
Experimentos 96 horas		
	Grupo	Média
Tempo 0 h	CTR	1,24 \pm 0,19
	CTRPi	1,3 \pm 0,42
	Cu	9,97 \pm 1,04
	CuPi	8,45 \pm 0,52
Tempo 48 h (antes da renovação)	CTR	2,25 \pm 0,29
	CTRPi	3,06 \pm 1,78
	Cu	10,06 \pm 1,94
	CuPi	5,95 \pm 0,95
Tempo 96 h	CTR	1,03 \pm 0,67
	CTRPi	2,23 \pm 0,35
	Cu	6,21 \pm 0,76
	CuPi	5,42 \pm 0,64

4.4 Discussão

No grupo exposto somente ao cobre houve uma mortalidade de 55% dos animais, no entanto, o resultado encontrado nos animais expostos ao Cu e à planta em conjunto foi de apenas 30% de óbitos. A CL50 desta espécie (pH 8; à 22 °C) é de 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu dissolvido na água após 96 horas (Carvalho e Fernandes, 2006),

sendo assim, era esperado que ocorresse mortalidade uma vez que o valor utilizado neste trabalho ($15 \mu\text{g.L}^{-1}$) ficou muito próximo. Este resultado mostra que a hipótese inicial do projeto, de que a planta *P. stratiotes* tem potencial para atenuar os efeitos do cobre sobre exemplares juvenis de curimba, foi confirmada.

Tal fato é corroborado por Victor et al., 2016, que expôs exemplares de *Sarotherodon melanotheron* ao Cd, Zn, Cu e Cr a valores iguais às respectivas CL50, e, simultaneamente às exposições foram colocados exemplares de *P. stratiotes* e *E. crassipes*, objetivando a fitorremediação. Como resultado, os peixes expostos aos metais e às plantas se mantiveram vivos por mais tempo do que o estipulado na respectiva CL50, comprovando, então, a eficácia da fitorremediação.

No experimento de 24 horas, entre o grupo CuPi, houve uma redução de 26% na concentração de cobre no tempo de 24 horas em comparação ao tempo 0. E, no experimento de 96 horas, entre o grupo CuPi, houve uma redução de 35% na concentração de cobre no tempo de 48 horas em relação ao tempo 0. Porém, apesar da renovação do meio de exposição os resultados do tempo de 96 horas se mostraram diferentes do esperado, não houveram mudanças significativas no grupo CuPi, e houve uma grande redução no grupo Cu (37%), o que pode ter ocorrido devido a algum erro analítico.

A *P. stratiotes* é conhecida pelo seu potencial hiperacumulador de metais, por isso, os resultados encontrados para a concentração de Cu na água, reiteram a tese de que a fitorremediação foi eficiente neste experimento. A tolerância da macrófita ao estresse gerado pela contaminação inclui vários ajustes de forma a reestabelecer o seu balanço metabólico (Li et al., 2022).

O método pelo qual a *P. stratiotes* geralmente realiza a fitorremediação é atração da fitoestabilização, onde os contaminantes são imobilizados pela adsorção

ou acúmulo nas raízes ou ainda precipitação no interior da zona da raiz e pela rizofiltração, na qual, as raízes adsorvem ou absorvem os contaminantes por precipitação ou sequestro (Jeevanantham et al., 2019).

No presente estudo, durante os experimentos foi observada a perda de raízes pelos exemplares de planta expostos Cu, o que segundo Farsene et al., 2014, e pode ser explicado devido à formação de um meristema de abscisão no ponto de inserção da raiz no caule, responsável por promover a queda das raízes, outros trabalhos também obtiveram o mesmo resultado: Vesely et al, 2012 com Fe, Li et al., com Cd e Olkhovych et al. 2016, com Cu.

Um acúmulo dos metais nas raízes e uma baixa translocação destes para a parte aérea foi observado na exposição de exemplares de *P. stratiotes* expostos ao Cd, Zn e As, respectivamente, por Das et al., 2014, Singh and Pandey, 2011 e De campos et al., 2019. Reafirmando que o método de fitorremediação utilizado por estas plantas é a rizofiltração e a fitoestabilização.

O Cu é um metal que, devido à sua natureza química de metal de transição de valência, pode aumentar a geração de ERO através das reações de Fenton e Haber–Weiss, quando em concentrações elevadas. Além disso, o Cu pode interferir diretamente em processos ou componentes do sistema antioxidante (Atli et al., 2006; Diaz-de-Alba et al., 2017).

Em razão disso, diversas alterações podem ser observadas nos peixes devido à exposição ao Cu, sendo elas dependentes da concentração do metal, da espécie exposta, da rota e do tempo de exposição. Um dos órgãos que desempenha mais funções na detoxificação de xenobióticos é o fígado, por isso, foi o órgão selecionado para as análises bioquímicas.

Um antioxidante não enzimático de grande importância é a GSH, tiol não

proteico mais abundante nas células, e que pode atuar em diferentes processos metabólicos: como protetor das células contra os compostos tóxicos; em reações redox, no transporte de aminoácidos e na eliminação de diversos contaminantes (Mijošek et al., 2019).

Nesse trabalho, os animais expostos ao Cu após 24 horas apresentaram uma tendência à redução ($p=0,083$), e, após 96 horas foi constatada estatisticamente esta redução da concentração de GSH, diferentemente dos outros grupos (CTR, CTRPi e CuPi), que apresentaram valores similares entre si. Isto pode ser resultado do consumo de GSH para proteger a célula contra a ação do Cu, e da interferência deste metal na síntese de GSH não havendo reposição desta molécula, mantendo seus níveis baixos e prejudicando seu sistema antioxidante (Javed et al., 2020). A concentração deste antioxidante também esteve reduzida em *P. lineatus* expostos ao Cu na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 horas (Roda et al., 2020). Além disso, como não houve alteração no grupo exposto ao contaminante e a planta, pode-se inferir que a fitorremediação foi eficiente, não permitindo que a ação do Cu modificasse a concentração de GSH nestes animais.

A SOD é uma das primeiras defesas antioxidantes, e é a enzima que tem papel de eliminar os radicais livres através da conversão destes em peróxido de hidrogênio, que, posteriormente, é convertido em hidrogênio e água pela enzima CAT ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), ou em glutathiona e água pela GPx ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{GSH} \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$). No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas no fígado na enzima SOD, CAT e GPx quando comparados os grupos de exposição.

Entretanto, em um estudo realizado com a mesma espécie com as concentrações de 9 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu no tempo de 96 horas foi constatado um aumento na atividade da SOD (Simonato et al., 2016), também com o mesmo

modelo e metal houve uma redução da atividade da CAT no fígado e um aumento nas brânquias dos peixes expostos por 96 horas a $24,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH 4,5) e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH 8,0) (Dos Santos Carvalho et al., 2015). No estudo de Goswami e Das (2018), onde *C. batrachus* foram expostos ao Cu durante 21 dias (5 e 10 mg L^{-1}) e à fitorremediação com a espécie *E. crassipes*, houve um aumento da atividade da enzima GPx que retornou a praticamente níveis de controle através da fitorremediação.

Através do desbalanço da produção de ERO, e da ineficácia do sistema antioxidante em defender efetivamente o organismo, podem ocorrer danos celulares, como por exemplo peroxidação lipídica, que é o processo pelo qual os ácidos graxos são oxidados interferindo na membrana celular fosfolipídica. Complementarmente existe a GST que, para contaminantes metálicos, pode agir sobre um dos produtos da LPO, tendo assim, ação antioxidante.

Não foram constatadas diferenças significativas tanto no conteúdo de LPO quanto na atividade da enzima GST no fígado de *P. lineatus* expostos ao Cu. Resultados diferentes deste já foram observados: aumento de LPO em *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de Cu no tempo de 96 horas (5 , 9 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$) (Simonato et al., 2016; Tesser et al., 2019), ou redução da LPO na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Roda et al. 2020), também, o aumento de 60% da atividade da GST ($24,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH 4,5) e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH 8,0) (Dos Santos Carvalho et al., 2015).

As MT são proteínas de baixo peso molecular especializadas em se ligarem e regularem os metais nos organismos, sendo importantes na homeostase dos metais essenciais e na detoxificação dos metais não essenciais (Weber et al., 2020). Estudos realizados com as espécies *P. lineatus* (Lunardelli et al., 2018) e *P. argentus* (Paschoalini et al., 2019) coletados em sítios contaminados com metais

apresentaram altas concentrações de MT no fígado em comparação à locais controle, ou seja, com pouca contaminação de metais. Todavia, na análise da concentração das MT no fígado dos animais do presente estudo não exibiu diferenças significativas entre os grupos experimentais, pois, possivelmente, o pool basal destas proteínas foi suficiente para neutralizar os efeitos do cobre no organismo.

A AChE é uma enzima do grupo das serina esterases, agindo na hidrólise da acetilcolina (neurotransmissor) nas sinapses colinérgicas, assegurando que o impulso e a transmissão sináptica funcionem corretamente. Os metais podem se ligar a esta enzima pela interação de sítios aniônicos e grupos tióis, o que afeta a hidratação do sítio ativo (Araújo et al., 2016; 2018). A inibição dessa enzima resulta em hiperexcitação pós-sináptica, promovendo alterações fisiológicas e comportamentais (Tilton et al., 2011), o que foi observado em exemplares de *P. lineatus* expostos ao Cu, no músculo e no cérebro, respectivamente, (Simonato et al., 2016; Roda et al., 2020), após 96 horas de exposição ao Cu. No entanto, neste trabalho, não foram encontradas alterações na atividade da AChE, tanto no cérebro quanto no músculo após 24 e 96 horas e exposição, o que pode ter ocorrido devido a maior resistência dos animais ao Cu pelo seu tamanho, já que a concentração é similar a outros estudos.

Em estudos com biomarcadores da via antioxidante é comum haver divergências, tanto pela concentração e mistura de compostos como pela diversidade de espécies, por isso há a necessidade da pesquisa, já que tais estudos fornecem subsídios para a grande diversidade biológica existente.

4.5 Conclusão

Conclui-se que o cobre, provocou danos letais e redução da GSH aos animais, e que a fitorremediação se mostrou promissora, já que, as alterações observadas foram mitigadas na presença de exemplares da planta. Além disso, a macrófita *P. stratiotes*, se mostrou uma hiperacumuladora de Cu em suas raízes. Logo, existem boas perspectivas de que a fitorremediação seja um método eficaz e menos custoso para o tratamento de águas contaminadas com cobre.

4.6 Agradecimentos

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

4.7 Referências bibliográficas

- ABRIL, S. I. M.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A. (2018). Metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hyphessobrycon luetkenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 211, p. 25-31 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.008>.
- AFONSO, T. F.; DEMARCO, C. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A.; ANDREAZZA, R. (2020) Bioprospection of indigenous flora grown in copper mining tailing area for phytoremediation of metals. *Journal of environmental management*, v. 256, p. 109953. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109953>
- AGOSTINHO, A. A., HARUMI, C. G., SUZUKI, I., JÚLIO Jr., H. F. Migratory fish of the Upper Paraná River Basin. *In*: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (2003). *Migratory fishes of South America*. World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada.

- ALVES-COSTA, J.R.M., MELA, M., DA SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, E., RANDI, M.A., 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, 82–88 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>
- ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; JUNIOR, L. B. C.; BEZERRA, R. S.; DE OLIVEIRA, M. B. M. (2016) Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquatic toxicology*, v. 177, p. 182-189. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.019>
- ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, K. C. C.; SOUZA, K. S.; AZEVEDO, R. S.; ALVES, M. H. M. E.; SILVA, L. C.; SILVA, V. L.; ADAM, M. C., JUNIOR, L. B. C., BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. M. (2018) Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, v. 205, p. 213-226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.017>
- ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S.; CANLI, M. (2006) Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, n. 2, p. 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.003>
- ATLI, G.; CANLI, M. (2010) Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 73, p. 1884–1889. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.005>
- AUTHMAN, M. M. N.; ZAKI, M. S.; KHALLAF, E. A.; ABBAS, H. H. (2015) Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, v. 6, n. 4, p. 1-13. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BARROSO, D. C.; PEREIRA, R. S.; ALESSIO, K. O.; BIZZI, C.; BALDISSEROTTO B.; VAL, A. L. (2020) Acute exposure to environmentally relevant concentrations of copper affects branchial and hepatic phosphoryl transfer network of *Cichlasoma amazonarum*: Impacts on bioenergetics homeostasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*:

- Toxicology & Pharmacology, p. 108846.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108846>
- BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, p. 882-890.
- BEUTLER, E. (1975) *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. 2nd ed. New York: Grune & Stratton.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília*, 18 mar. 2005. n. 053, p. 58-63. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: fev. 2021.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 463, de 24 de julho de 2014. Dispõe sobre o controle ambiental de produtos destinados à remediação. *Diário Oficial da União, Brasília*, 30 de julho de 2014. n. 144, p. 85. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/remediadores/conama_463.pdf> Acesso em: jan. 2022.
- CAMEJO G.; HURT-CAMEJO E.; WIKLUND O.; BONDJERS G. (1998) Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*, v. 139, p. 205-222. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00107-5)
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. (2006) Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, v. 251, n. 1, p. 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.018>
- CARVALHO, RIBEIRO, K. D., MOREIRA, R. M., DE ALMEIDA, A. M. (2017).

- Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 37-41 <https://doi.org/10.22571/Actabra13201758>.
- DAS, S.; GOSWAMI, S.; TALUKDAR, A. D. A study on cadmium phytoremediation potential of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 92, n. 2, p. 169-174, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1152-y>
- DE CAMPOS, F. V., DE OLIVEIRA, J. A., DA SILVA, A. A., RIBEIRO, C., DOS SANTOS FARNESE, F. (2019) Phytoremediation of arsenite-contaminated environments: is *Pistia stratiotes* L. a useful tool? *Ecological Indicators*, v. 104, p. 794-801. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.04.048>
- DIAZ-DE-ALBA, M.; RAYA, A. C.; GRANADO-CASTRO, M. D.; RAMÍREZ, M. O.; EL MAI, B.; GARCÍA, F. C.; TROYANO-MONTORO, M.; ESPADA-BELLIDO E., SANTIAGO R. T.; GALINDO-RIAÑO, M. D. (2017) Biomarker responses of Cu-induced toxicity in European seabass *Dicentrarchus labrax*: Assessing oxidative stress and histopathological alterations. *Marine pollution bulletin*, v. 124, n. 1, p. 336-348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.039>
- DOGAN, Z.; EROGLU A.; KANAK, E.G.; ATLI, G.; CANLI, M. (2014) Response of antioxidant system of tilapia (*Oreochromis niloticus*) following exposure to chromium and copper in differing hardness. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v. 92, p. 680–686. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-014-1245-2>
- DOS SANTOS CARVALHO, C.; BERNUSSO, V. A.; FERNANDES, M.N. (2015) Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquatic Toxicology*, v. 167, p. 220-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.003>
- ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*, v. 7, p. 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- FARNESE, F. D. S., OLIVEIRA, J. A., LIMA, F. S., LEÃO, G. A., GUSMAN, G. S., SILVA, L. C. (2014). Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L.(water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, p. S108-S112. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.04.048>
- FRY, K L.; WHEELER, C. A.; GILLINGS, M. M.; FLEGAL, A. R.; TAYLOR, M. P.

- (2020) Anthropogenic contamination of residential environments from smelter As, Cu and Pb emissions: Implications for human health. *Environmental Pollution*, v. 262, p. 114235. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114235>
- GALAL, T. M.; FARAHAT, E. A. (2015) The invasive macrophyte *Pistia stratiotes* L. as a bioindicator for water pollution in Lake Mariut, Egypt. *Environmental monitoring and assessment*, v. 187, n. 11, p. 701. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4941-4>
- GOSWAMI, S.; DAS, S. (2018) *Eichhornia crassipes* mediated copper phytoremediation and its success using catfish bioassay. *Chemosphere*, v. 210, p. 440-448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.044>
- HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. (1973) Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology*. 25, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>
- JAVED, M.; ABBAS, K.; AHMED, T.; ABDULLAH, S.; NAZ, H.; AMJAD, H. (2020) Metal pollutants induced peroxidase activity in different body tissues of freshwater fish, *Labeo rohita*. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v. 2, p. 162-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enceco.2020.09.001>
- 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*, v. 13, p. 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.12.007>
- KIM, J. J.; KIM, Y.S.; KUMAR, V. (2019) Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
- KEEN J.H.; HABIG W.H.; JAKOBY W.B. (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione S- transferases. *The Journal of Biology Chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183-6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- LAKRA, K. C.; LAL, B.; BANERJEE, T. K. (2019) Application of phytoremediation technology in decontamination of a fish culture pond fed with coal mine effluent using three aquatic macrophytes. *International journal of phytoremediation*, v. 21, n. 9, p. 840-848. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1568384>
- LI, Y., XIN, J., GE, W., TIAN, R. (2022) Tolerance mechanism and phytoremediation potential of *Pistia stratiotes* to zinc and cadmium co-contamination. *International*

Journal of Phytoremediation, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2021.2025201>

- LUNARDELLI, B.; CABRAL, M. T.; VIEIRA, C. E.; OLIVEIRA, L. F.; RISSO, W. E.; MELETTI, P. C.; MARTINEZ, C. B. (2018) Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 153, p. 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.023>
- MALIK, N.; BISWAS, A.K.; QURESHI, T.A. (2010) Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bophal. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 160, n. 1-4, p. 267-276. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0693-8>
- MCCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- MIJOŠEK, T.; MARIJIĆ, V. F.; DRAGUN, Z.; KRASNIĆI, N.; IVANKOVIĆ, D.; ERK, M. (2019) Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Science of the Total Environment*, v. 660, p. 1079-1090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.045>
- OLKHOVYCH, O., Volkogon, M., Taran, N., Batsmanova, L., & Kravchenko, I. (2016). The effect of copper and zinc nanoparticles on the growth parameters, contents of ascorbic acid, and qualitative composition of amino acids and acylcarnitines in *Pistia stratiotes* L.(Araceae). *Nanoscale Research Letters*, v. 11, n. 1, p. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1422-9>
- PASCHOALINI, A. L.; SAVASSI, L. A.; ARANTES, F. P.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. (2019) Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 169, p. 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>
- PINHEIRO-SOUSA, D. B.; JUNIOR, A. R. T.; SILVA, D.; SANTOS, R. L.; NETA, R. N. F. C. (2019) A screening test based on hematological and histological biomarkers to evaluate the environmental impacts in tambaqui (*Colossoma macropomum*) from a protected area in Maranhão, Brazilian Amazon. *Chemosphere*, v. 214, p. 445-451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.146>

- PUTRA, R. S.; CAHYANA, F.; NOVARITA, D. (2015) Removal of lead and copper from contaminated water using EAPR system and uptake by water lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). *Procedia chemistry*, v. 14, n. 2015, p. 381-386. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.052>
- QUIAN, J. H., ZAYED, A., ZHU, Y. L., YU, M., & TERRY, N. (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America*, 28: 1448–1455. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800050009x>
- RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2020) Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 242, p. 110659. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110659>
- ROMEIRO, S., LAGÔA, A. M. M. A., FURLANI, P. R., ABREU, C. A. D., PEREIRA, B. F. F. (2007). Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, 66, 327-334. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000200017>
- SIMONATO, J. D.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RANDI, M. A.; CARVALHO, P. S.; MELLETTI, P.C.; ASSIS, H.C.S.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. (2016) Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*, v. 170, p. 31-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- SINGH, K.; PANDEY, S. N. (2011). Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Journal of environmental biology*, v. 32, n. 3, p. 391.
- TESSER, M. E.; DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MONTEIRO, R. A.; SANTO PEREIRA, A. D. E.; FRACETO, L. F.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2020) Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Science of The Total Environment*, v. 704, p. 135332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. (2011) Swimming impairment

and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 153, n. 1, p. 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.008>

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*, v. 7, n. 1, p. 17-26. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0089-z>

VESELÝ, T.; TLUSTOŠ, P.; SZÁKOVÁ, J. (2012). Organic acid enhanced soil risk element (Cd, Pb and Zn) leaching and secondary bioconcentration in water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) in the rhizofiltration process. *International journal of phytoremediation*, v. 14, n. 4, p. 335-349.

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; DO AMARAL CRISPIM, B.; DE CARVALHO CAVALCANTE, D. N.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. (2018) The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 75, n. 3, p. 476-485. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, F. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. (1997) *Marine Environmental Research*, v. 44, p. 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

VICTOR, K. K.; SÉKA, Y.; NORBERT, K. K.; SANOGO, T. A.; CELESTIN, A. B. (2016) Phytoremediation of wastewater toxicity using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*). *International Journal of phytoremediation*, v. 18, n. 10, p. 949-955. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1183567>

WEBER, P., BEHR, E. R., KNORR, C. D. L., VENDRUSCOLO, D. S., FLORES, E. M., DRESSLER, V. L., BALDISSEROTTO, B. (2013). Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 61-66, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.004>

WEBER, A. A.; SALES, C. F.; DE SOUZA FARIA, F.; MELO, R. M. C.; BAZZOLI, N.;

RIZZO, E. (2020) Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 190, p. 110165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

5 CONCLUSÃO GERAL

Portanto, são necessários mais estudos sobre a fitorremediação e sua capacidade em remover e reverter os efeitos dos metais nos peixes dulcícolas, já que, neste estudo, o cobre provocou danos letais e redução da GSH a *Prochilodus lineatus*, os quais foram mitigadas na presença da planta. Além disso, para acrescentar dados para uma melhor conservação de ecossistemas contaminados com cobre, a macrófita *P. stratiotes* é uma ótima opção, já que se mostrou como uma hiperacumuladora de Cu em suas raízes. Porém, experimentos em campo e em larga escala seriam necessários para confirmar a viabilidade do uso de *P. stratiotes* na melhoria da qualidade de vida de *Prochilodus lineatus* e de ambientes contaminados com Cu.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A seguir estão contidas as referências utilizadas na introdução geral:

- ABRIL, S. I. M.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A. (2018). Metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hyphessobrycon luetkenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 211, p. 25-31 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.008>.
- AFONSO, T. F.; DEMARCO, C. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A.; ANDREAZZA, R. (2020) Bioprospection of indigenous flora grown in copper mining tailing area for phytoremediation of metals. *Journal of environmental management*, v. 256, p. 109953. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109953>
- AGOSTINHO, A. A., HARUMI, C. G., SUZUKI, I., JÚLIO Jr., H. F. Migratory fish of the Upper Paraná River Basin. *In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (2003). Migratory fishes of South America. World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada.*
- ALIKASTURI, A. S.; KAMIL, M. Z. A. M.; SHAKRI, N. A. A. M.; SERIT, M. E.; RAHIM, N. S. A.; SHAHARUDDIN, S.; ANUAR, M.R.; RADZI, A. R. M. (2019) Phytoremediation of copper in mineral, distilled and surface water using *Limnocharis flava* plant. *Materials Today: Proceedings*, v. 19, p. 1489-1496. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.173>
- ALVIM, T. T.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2019) Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 842, p. 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>
- AMIARD-TRIQUET, C; AMIARD, J; MOUNEYRAC, C. (2015) *Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks. Academic Press. p. 503.*
- ANSARI, A. A., Naeem, M., Gill, S. S., & AlZuaibr, F. M. (2020). Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 46, n. 4, p. 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>
- ATLI, G.; CANLI, M. (2010) Response of antioxidant system of freshwater fish

Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 73, p. 1884–1889. <https://doi:10.1016/j.ecoenv.2010.09.005>

AUTHMAN, M. M. N.; ZAKI, M. S.; KHALLAF, E. A.; ABBAS, H. H. (2015) Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, v. 6, n. 4, p. 1-13. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BARROSO, D. C.; PEREIRA, R. S.; ALESSIO, K. O.; BIZZI, C.; BALDISSEROTTO B.; VAL, A. L. (2020) Acute exposure to environmentally relevant concentrations of copper affects branchial and hepatic phosphoryl transfer network of *Cichlasoma amazonarum*: Impacts on bioenergetics homeostasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, p. 108846. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108846>

BILAL M.; SHAH J. A.; ASHFAQ T.; GARDAZI S. M. H.; TAHIR A. A.; PERVEZ A.; HAROON H.; MAHMOOD Q. (2013) Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater – A review. *Journal of Hazardous Materials*. v. 263, p. 322-333. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.071>

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 463, de 24 de julho de 2014. Dispõe sobre o controle ambiental de produtos destinados à remediação. *Diário Oficial da União, Brasília*, 30 de julho de 2014. n. 144, p. 85. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/remediadores/conama_463.pdf> Acesso em: jan. 2022.

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

- BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm> Acesso em: fev. 2021.
- DOGAN, Z.; EROGLU A.; KANAK, E.G.; ATLI, G.; CANLI, M. (2014) Response of antioxidant system of tilapia (*Oreochromis niloticus*) following exposure to chromium and copper in differing hardness. Bull. Environ. Contam. Toxicol. v. 92, p. 680–686. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-014-1245-2>
- DOS SANTOS CARVALHO, C.; BERNUSSO, V. A.; FERNANDES, M.N. (2015) Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). Aquatic Toxicology, v. 167, p. 220-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.003>
- FADHLAOUI, M.; COUTURE, P. (2016) Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). Aquatic Toxicology, v. 180, p. 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- FRY, K L.; WHEELER, C. A.; GILLINGS, M. M.; FLEGAL, A. R.; TAYLOR, M. P. (2020) Anthropogenic contamination of residential environments from smelter As, Cu and Pb emissions: Implications for human health. Environmental Pollution, v. 262, p. 114235. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114235>
- GALAL, T. M.; FARAHAT, E. A. (2015) The invasive macrophyte *Pistia stratiotes* L. as a bioindicator for water pollution in Lake Mariut, Egypt. Environmental monitoring and assessment, v. 187, n. 11, p. 701. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4941-4>
- GOSWAMI, S.; DAS, S. (2018) *Eichhornia crassipes* mediated copper phytoremediation and its success using catfish bioassay. Chemosphere, v. 210, p. 440-448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.044>
- GUO, X.; LIU, M.; ZHONG, H.; LI, P.; ZHANG, C.; WEI, D.; ZHAO, T. (2020) Potential of *Myriophyllum aquaticum* for phytoremediation of water contaminated with tetracycline antibiotics and copper. Journal of Environmental Management, v. 270, p. 110867. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110867>
- HOUGHTON, P.; REN, Y.; HOWES, M. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Nat Prod Rep, v. 23, p.181-99. <https://doi.org/10.1039/B508966M>

- HU, R. (2020) Pollution control and remediation of rural water resource based on urbanization perspective. *Environmental Technology & Innovation*, v. 20, p. 101136. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101136>
- 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*, v. 13, p. 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.12.007>
- KIM, J. J.; KIM, Y.S.; KUMAR, V. (2019) Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
- LAKRA, K. C.; LAL, B.; BANERJEE, T. K. (2019) Application of phytoremediation technology in decontamination of a fish culture pond fed with coal mine effluent using three aquatic macrophytes. *International journal of phytoremediation*, v. 21, n. 9, p. 840-848. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1568384>
- LE CROIZIER, G.; LACROIX, C.; ARTIGAUD, S.; LE FLOCH, S.; RAFFRAY, J.; PENICAUD, V.; COQUILLÉ, V.; AUTIER, J.; ROUGET, M.L.; BAYON, N.; LAË, R.; MORAIS, L.T. (2018) Significance of metallothioneins in differential cadmium accumulation kinetics between two marine fish species. *Environmental pollution*, v. 236, p. 462-476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.002>
- LEONEL, A. G.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. (2020) Advanced Functional Nanostructures based on Magnetic Iron Oxide Nanomaterials for Water Remediation: A Review. *Water Research*, p. 116693. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116693>
- LI, Y., XIN, J., GE, W., TIAN, R. (2022) Tolerance mechanism and phytoremediation potential of *Pistia stratiotes* to zinc and cadmium co-contamination. *International Journal of Phytoremediation*, p. 1-8. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.2025201>
- MAHMOUD, M. E.; OSMAN, M. M.; YAKOUT, A. A.; ABDELFAH, A. M. (2019) Green nanosilica@ folic Acid (VB9) nanocomposite for engineered adsorptive water remediation of bivalent lead, cadmium and copper. *Powder Technology*, v. 344, p. 719-729. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.12.055>
- MALIK, N.; BISWAS, A.K.; QURESHI, T.A. (2010) Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bophal. *Environmental Monitoring and*

Assessment, v. 160, n. 1-4, p. 267-276. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0693-8>

- NIKINMAA, M. (2014) An introduction to aquatic toxicology. Academic Press, 240 p.
- 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*, v. 601, p. 1263-1270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.003>
- PINHEIRO-SOUSA, D. B.; JUNIOR, A. R. T.; SILVA, D.; SANTOS, R. L.; NETA, R. N. F. C. (2019) A screening test based on hematological and histological biomarkers to evaluate the environmental impacts in tambaqui (*Colossoma macropomum*) from a protected area in Maranhão, Brazilian Amazon. *Chemosphere*, v. 214, p. 445-451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.146>
- PUTRA, R. S.; CAHYANA, F.; NOVARITA, D. (2015) Removal of lead and copper from contaminated water using EAPR system and uptake by water lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). *Procedia chemistry*, v. 14, n. 2015, p. 381-386. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.052>
- QUIAN, J. H., ZAYED, A., ZHU, Y. L., YU, M., & TERRY, N. (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America*, 28: 1448–1455. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800050009x>
- RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2020) Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 242, p. 110659. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110659>
- ROMEIRO, S., LAGÔA, A. M. M. A., FURLANI, P. R., ABREU, C. A. D., PEREIRA, B. F. F. (2007). Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, 66, 327-334. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000200017>
- SFAKIANAKIS, D. G.; RENIERI, E; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A. M. (2015) Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, v.

- 137, p. 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- SANTOS, C.; DE OLIVEIRA, M. T.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M.; SOFIA, S. H.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2018) Expression of cyp1a induced by benzo (A) pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 61, p. 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.008>
- SANTOS-SILVA, T. G.; MONTAGNER, C. C.; MARTINEZ, C. B. R. (2018) Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 58, p. 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.002>
- SILVA, K.C.C.; ASSIS, C. R. D.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. (2013) Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, v. 126, p. 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.001>
- SIMONATO, J. D.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RANDI, M. A.; CARVALHO, P. S.; MELLETI, P.C.; ASSIS, H.C.S.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. (2016) Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*, v. 170, p. 31-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- TESSER, M. E.; DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MONTEIRO, R. A.; SANTO PEREIRA, A. D. E.; FRACETO, L. F.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2020) Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Science of The Total Environment*, v. 704, p. 135332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- 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*, v. 7, n. 1, p. 17-26. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0089-z>
- VICTOR, K. K.; SÉKA, Y.; NORBERT, K. K.; SANOGO, T. A.; CELESTIN, A. B. (2016) Phytoremediation of wastewater toxicity using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*). *International Journal of phytoremediation*, v. 18, n. 10, p. 949-955.

<https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1183567>

- VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; DO AMARAL CRISPIM, B.; DE CARVALHO CAVALCANTE, D. N.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. (2018) The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 75, n. 3, p. 476-485. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>
- VIEIRA, L. C.; DE ARAUJO, L. G.; DE PADUA FERREIRA, R. V.; DA SILVA, E. A.; CANEVESI, R. L. S.; MARUMO, J. T. (2019) Uranium biosorption by *Lemna* sp. and *Pistia stratiotes*. *Journal of environmental radioactivity*, v. 203, p. 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.03.019>
- VITAS, S.; KEPLINGER, T.; REICHHOLF, N.; FIGI, R.; CABANE, E. (2018) Functional lignocellulosic material for the remediation of copper (II) ions from water: Towards the design of a wood filter. *Journal of hazardous materials*, v. 355, p. 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.015>
- WANG, N.; JIANG, M.; ZHANG, P.; SHU, H.; LI, Y.; GUO, Z.; LI, Y. (2019) Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere*, v. 245, p. 125613. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125613>
- WEBER, P., BEHR, E. R., KNORR, C. D. L., VENDRUSCOLO, D. S., FLORES, E. M., DRESSLER, V. L., BALDISSEROTTO, B. (2013). Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 61-66, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.004>

ANEXO

Normas para submissão de manuscritos para o periódico Ecotoxicology

Disponível em: <https://www.springer.com/journal/10646/submission-guidelines#Instructions%20for%20Authors>

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently

thereafter.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.: *Italic* for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities **Roman/upright** for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative) **Bold** for vectors, tensors, and matrices.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses.

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "<https://doi.org/abc>").

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript,

not in the figure file.

- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.