

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**EFEITO DO AMBIENTE ALTERADO NO EPITÉLIO DA ESCAMA, NAS  
BRÂNQUIAS E NA ALIMENTAÇÃO DE *Prochilodus lineatus***

**REBECA MAMEDE DA SILVA ALVES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Fevereiro - 2015**

Rebeca Mamede da Silva Alves

**Efeito do ambiente alterado no epitélio da escama, nas  
brânquias e na alimentação de *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –  
*campus* de Rio Claro, como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biológicas (Biologia Celular e  
Molecular)

**Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro**

Rio Claro-SP  
2015

597      Alves, Rebeca Mamede da Silva  
A474e      Efeito do ambiente alterado no epitélio da escama, nas  
brânquias e na alimentação de *Prochilodus lineatus* / Rebeca  
Mamede da Silva Alves. - Rio Claro, 2015  
84 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Flávio Henrique Caetano  
Coorientador: Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro

1. Peixe. 2. Morfologia. 3. Detergente. I. Título.

*Àquela liberdade que o conhecimento e a dedicação nos trazem.  
Aos custos que as nossas realizações nos tem e às suas recompensas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo incentivo e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (Processos nº 2012/08446-5 e 2012/03414-9).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), pelo apoio e por disponibilizar a infra-estrutura para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, pelo apoio e dedicação. Sem quem eu não traria o trabalho até onde trouxe e que não mediu esforços para que eu chegasse onde cheguei.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro, da Universidade de Coimbra - Portugal, pela colaboração no trabalho, que somou ainda mais uma dimensão importante aos estudos.

Aos colegas de laboratório, Dr. Bruno Fiorelini Pereira, que nunca mediu esforços para me ajudar e me ensinou o que é pesquisa e dedicação. À Cynthia Medina Ciamarro pela parceria e auxílio durante o desenvolvimento do projeto e também ao João Rodolfo Tuckumantel. Ao Dr. Dimitrius Leonardo Pitol, pela parceria durante o projeto.

À Piscicultura Polettini – Mogi-Mirim, SP, Brasil, pela doação dos espécimes utilizados. À Aquarius Rio Claro, pelo auxílio na manutenção dos experimentos. Em especial ao proprietário, Rogério José Hebling.

À UNESP de Rio Claro, ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Biologia, aos Laboratórios de Histologia e Microscopia Eletrônica e ao Escritório Regional de Apoio à Pesquisa e à Internacionalização. Em especial, aos servidores técnicos e administrativos que me auxiliaram durante o projeto: Anderson Rodrigues, Antonio Teruyoshi Yabuki, Cristiane Marcia Mileo, Felipe Marchi Guimarães, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte e Rosemary D. Oliveira S. Cardoso.

Aos professores vinculados ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Aos meus pais, Henrique Monteiro Alves e Regina Lúcia M. da Silva Alves, que fazem parte de todas as minhas realizações. Aos meus irmãos, Henrique Monteiro Alves Filho, Renata M. da Silva Alves e Susana Monteiro Alves, que aprenderam comigo e me apoiam sempre. Em particular a meu pai pelo apoio incondicional e imprescindível e à minha irmã e colega bióloga, Renata, pelo auxílio profissional e pessoal (por chorar comigo!).

Aos amigos, companheiros biólogos de república que ainda moram comigo e aos que já foram: Alexandre Hideaki Takara, Carlos Otávio Araújo Gussoni, Claudia Zukeran Kanda, Danilo José Lima de Sousa, Fellipe Chaves Nominato, Igor Vinicius Ramos Otero, Laura Kyoko Honda, Henrique Hespanhol Tozzi, Paola Mandetta Tokumoto, Paulo Roberto de Moura Souza Filho, Raissa Fonseca, Rafael Horita Sugohara, Thales Henrique Dias Leandro. Ao Tenébrio, à Tocha, à Lucy e à Yasha.

Aos amigos, parceiros biólogos que não moraram comigo, mas fizeram praticamente isso: Amanda Maria Picelli, Annelise Francisco, Danilo Barêa Delgado e Eliziane Garcia.

Aos amigos de longa data, Camila Strongren e Joaquim Rodrigues Neto. Aos colegas cotidianos de faculdade, e àqueles fora dela também.

“Our lives are like this, we think this one thing is going to happen and something else happens instead.”

(Kathryn Schulz, *On being wrong*)

## Resumo

Devido à crescente preocupação com a poluição global torna-se cada vez mais importante voltar a atenção para a avaliação de efeitos letais e subletais de agentes tóxicos, utilizando-se de técnicas de diagnóstico que sejam as mais informativas possível. Além disso há uma busca por técnicas de amostragem não-invasivas ou não-letais, que representem uma alternativa atrativa aos métodos tradicionais de monitoramento de contaminação em peixes. E também técnicas que permitam identificar os efeitos de agentes tóxicos em diversos níveis de organização biológica, conferindo uma visão ampla das conseqüências da exposição a contaminantes. Lembrando que detergentes biodegradáveis são contaminantes comuns em corpos de água e que o LAS (aquil-benzeno sulfonato linear) representa um dos surfactantes aniônicos mais utilizados do mercado, o projeto pretendeu estudar alterações morfológicas (histológicas, histoquímicas e ultraestruturais) do epitélio que recobre as escamas de *Prochilodus lineatus*, quando da exposição direta e constante a duas diluições de LAS. Este estudo visa também avaliar a sensibilidade relativa e a relevância ecológica de tais efeitos comparando-os com as possíveis alterações na taxa de alimentação dos peixes e a morfologia das brânquias e estabelecer a análise morfológica do epitélio das escamas como um nova técnica de avaliação ambiental não-invasivo confiável e comparável aos métodos clássicos. Os resultados mostraram que a exposição a concentrações mais altas de surfactante causaram danos mais severos nas brânquias, mas as menores concentrações também afetaram o órgão. A morfologia do epitélio também apresentou modificações em resposta à presença do LAS, mas os experimentos de alimentação não registraram alterações na alimentação dos animais. Assim, a sensibilidade do epitélio das escamas comparada a métodos tradicionais o torna um marcador ambiental de grande potencial em peixes.

**Palavras-chave:** *Prochilodus*, escama, pele, peixe, detergente, técnica não-invasiva.

## **Abstract**

Global pollution has turned our attention to assessing lethal and sublethal effects of toxic agents using the most informative techniques possible. We must seek non-invasive or non-lethal sampling methods which represent an attractive alternative to traditional techniques of environmental assessment in fish. Find techniques that allow identification of toxic effects in several levels of biological organization, providing a broad view of the consequences of toxicant exposure. Keeping in mind that detergents are a common contaminant in water bodies and that LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate) is one of the most commonly used anionic surfactant on the market, our project attempts to study morphological alterations (histological, histochemical and ultrastructural) of the scale epithelium of *Prochilodus lineatus* exposed to two concentrations of LAS. We also wish to evaluate relative sensibility and ecological relevance of such effects comparing them to effects upon feeding rates and brachial morphology and establish morphological analysis of the scale epithelium as a new non-lethal environmental assessment technique that is reliable and comparable to classic methods. Results show that exposure to higher doses of surfactant caused severe damage to gill tissue, although lower doses also affected the organ. Epithelium morphology was also altered in response to LAS, but feeding experiments showed no alterations in feeding rates. Thus, scale epithelium sensibility compared to traditional methods makes it a potentially reliable environmental marker in fish.

**Key words:** *Prochilodus*, scale, skin, fish, detergent, non-invasive technique.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>2. Objetivos</b> .....	12
<b>3. Revisão bibliográfica</b> .....	13
3.1 O revestimento dos teletósteos.....	13
3.2 O uso de peixes e do tecido epitelial como bioindicadores.....	16
3.3 O uso das brânquias como indicadores.....	18
3.4 Detergentes biodegradáveis.....	21
3.5 Depressão alimentar.....	23
3.6 <i>Prochilodus lineatus</i> .....	24
<b>4. Material e métodos</b> .....	28
4.1 Material.....	28
4.2 Métodos.....	30
a) Amostragem e tratamentos.....	30
b) Protocolos para análises histológicas e histoquímicas.....	32
c) Protocolo para análise ultraestrutural.....	34
d) Análises ultraestruturais, morfométricas e estatísticas.....	34
e) Comportamento alimentar.....	37
<b>5. Resultados</b> .....	39
5.1 Morfologia das brânquias.....	39
5.2 Contagem de células de muco.....	41
5.3 Contagem de células club.....	42
5.4 Análise de espessura.....	43
5.5 Técnicas qualitativas.....	47
5.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	49
5.7 Experimentos de alimentação.....	51
<b>6. Discussão</b> .....	53
6.1 Análise das brânquias.....	53
6.2 Células de muco.....	56
6.3 Células club.....	59
6.4 Espessura do epitélio.....	61
6.5 Experimentos de alimentação.....	63
6.3 Efeitos do LAS e qualidade da água.....	65

<b>7. Conclusão</b> .....	67
<b>8. Referências bibliográficas</b> .....	68
<b>9. Anexos</b> .....	81
9.1 Anexo I.....	81
9.2 Anexo II.....	84

## 1. Introdução

Devido à crescente preocupação com a poluição global torna-se cada vez mais importante voltar a atenção para a avaliação de efeitos letais e subletais de agentes tóxicos, com as técnicas de diagnóstico mais informativas possíveis (ANDERSON et al., 1994). Além disso há uma busca por técnicas de amostragem não-invasivas ou não-letais, que representam uma alternativa atrativa para os métodos tradicionais de monitoramento de contaminação em peixes (HELTSLEY et al., 2005); e também uma busca por técnicas que permitam identificar os efeitos de agentes tóxicos em diversos níveis de organização biológica, conferindo uma visão ampla das conseqüências da exposição a contaminantes (ANDERSON et al., 1994).

Em ambientes aquáticos os peixes são alguns dos principais organismos comumente utilizados na avaliação de impactos ambientais, de forma que essas populações são adequadas para estudos de toxicidade (GOULART & CALISTO, 2003). Entre as espécies-alvo aquelas do gênero *Prochilodus* são comumente utilizadas nas pesquisas e os peixes da espécie *P. lineatus* (Curimatá), a espécie escolhida para o projeto, são muito utilizados em estudos de toxicidade (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; MADUENHO et al., 2007; MARTINEZ & SOUZA, 2002; MARTINEZ et al., 2004; PEREIRA, 2014; PEREIRA et al., 2012a; PEREIRA et al., 2012b; SIMONATO et al., 2008). Por se tratar de uma espécie sensível que permite a análise dos efeitos de poluentes (MADUENHO et al., 2007) e por ser abundante nos rios da região, que recebem continuamente contaminantes similares àquele que testado.

Além disso, a análise das mudanças morfológicas constitui uma ferramenta eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações quase letais (ROMÃO et al., 2006) e técnicas histológicas são muito utilizadas para avaliação dos impactos ambientais, pois permitem a análise de órgãos-alvo afim de detectar os efeitos e lesões provocadas por agentes contaminantes (SANTANA, 2004; SCHWAIGER et al., 1997).

Ademais, a possibilidade de correlacionar efeitos histológicos a parâmetros ecologicamente relevantes, como a taxa de alimentação, permite a obtenção de uma ampla visão sobre as conseqüências da exposição a contaminantes que é tão necessária para estudos ecotoxicológicos (ANDERSON et al., 1994; MALTBY, 1994).

O uso da escama como bioindicador já foi e ainda é explorado por diversos autores (ABDULLAH et al., 1976; BURGER et al., 2013; CLEARWATER, FARAG & MEYER, 2002; CHIVERS et al., 2007; COELLO & KHAN, 1996; DUA & GUPTA, 2005; LAKE et al., 2006; MUGIYA, HAKOMORI & HATSUTORI, 1991; QUIRÓS et al., 2007; RASHED, 2001;

RISHI & JAIN, 1998), mas nunca houve ênfase na avaliação morfológica do tecido epitelial que as recobre. O presente trabalho segue como continuação de trabalhos prévios (*dados não publicados*) para refinar a técnica de avaliação ambiental utilizando o epitélio das escamas, agora solidificando sua aplicação com testes mais específicos, de maior reprodutibilidade e análises quantitativas. Além disso, os resultados são relacionados a outro método de avaliação ambiental não invasivo e já utilizado por diversos autores, a depressão alimentar (AGOSTINHO et al., 2012).

Como a brânquia é considerada o alvo de vários tipos de contaminantes, alterações morfológicas na sua estrutura são amplamente utilizadas como indicadores de contaminação (MAZON et al., 2002). Assim, a presença de modificações estruturais nas brânquias dos mesmos indivíduos nos quais verifica-se a presença de modificações nas escamas pode validar a eficiência do uso do epitélio das escamas como bioindicador.

Por fim, dentre os contaminantes de ambientes aquáticos os detergentes são alguns dos compostos mais presentes (HERA, 2009). Os detergentes a base de alquil-benzeno sulfonato linear (LAS) representam um dos surfactantes aniônicos mais utilizados do mercado e diversos autores exploraram efeitos tóxicos desse composto e sua concentração em diversos tipos de águas e efluentes (MUNGRAY & KUMAR, 2009).

## 2. Objetivos

O presente estudo objetivou verificar possíveis alterações morfológicas na ultraestrutura, histoquímica e histologia do epitélio das escamas e nas brânquias de indivíduos de *P. lineatus* expostos a diluições de LAS e correlacioná-las a alterações no comportamento alimentar dos mesmos animais expostos ao agente detergente. Os objetivos específicos foram:

- Identificar possíveis alterações ultra e histomorfológicas (padrões de microcristas, forma do núcleo, conteúdo de colágeno, conteúdo ácido, número de células de muco, número de células club e espessura do epitélio) após a exposição ao surfactante, em comparação a um grupo controle;
- Detectar alterações no consumo alimentar dos indivíduos expostos ao surfactante em comparação a um grupo controle;
- Identificar possíveis alterações morfológicas nas brânquias dos indivíduos expostos ao surfactante, comparados a um grupo controle;
- Identificar os componentes químicos presentes nas águas testadas;
- Validar o uso dos dados obtidos na análise morfológica do epitélio das escamas comparando com as análises histológicas das brânquias.
- Avaliar a relevância ecológica das alterações histológicas por comparação da sensibilidade da análise com a sensibilidade das análises de depressão alimentar.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1. O revestimento dos teleósteos

O revestimento do corpo dos vertebrados é composto da epiderme externa e a derme subjacente, onde existe vasos sanguíneos, nervos e pigmento. Por ser sujeita à abrasão, essa pele é substituída por divisões mitóticas em sua camada basilar, o estrato germinativo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; STORER, 2007).

Segundo Storer (2007), nos peixes, o corpo é todo revestido por uma epiderme lisa, fina e glandular, intimamente aposta às escamas inseridas na derme; escamas essas geralmente finas [200 a 300  $\mu\text{m}$  segundo Zhu et al. (2011)] imbricadas e ósseas. O tronco e a cauda apresentam escamas organizadas em fileiras longitudinais e diagonais, cada uma inserida numa bolsa dérmica e crescendo durante a vida do animal (ORR, 1908; STORER, 2007). A porção livre, portanto, é coberta por uma fina camada de pele (STORER, 2007).

O termo escama tem sido generalizado para todos os elementos de esqueleto duros, geralmente achatados, encontrados na pele de vertebrados aquáticos (SIRE & AKIMENKO, 2004); O que inclui escamas placóides, ganóides e elasmóides. Apesar de estes apêndices derivarem de um ancestral comum (SIRE & HUYSSEUNE, 2003; SIRE & AKIMENKO, 2004), têm estruturas muito diferentes. Assim, segundo Sire & Akimenko (2004), ao se referir a uma escama, é necessário que o tipo seja especificado, lembrando que a maioria das escamas nos teleósteos é do tipo elasmóide.

As escamas elasmóides são placas colagênicas ornamentadas, finas e lamelares, localizadas dentro da região da derme, próximas à epiderme (SIRE & AKIMENKO, 2004). Como outros elementos do esqueleto dérmico, se formam na derme sem a presença de molde cartilaginoso (FRANCILLON-VIEILLOT et al., 1990; SIRE & AKIMENKO, 2004) e há vários tipos diferentes de escamas elasmóides.

Os membros da Ordem Amiiformes, na qual se encontra a Infraclasse Teleostei, apresentam escamas geralmente elasmóides do tipo ciclóides, isto é, não possuem os muitos espinhos pequenos que recobrem a parte posterior exposta das escamas ctenóides (STORER, 2007).

A escamas ciclóides são sub-circulares, em forma de disco e pouco espessas (PANFILI et al., 2002). Essas escamas aumentam de tamanho com o crescimento do peixe e como consequência, em muitas espécies esse crescimento determina o aparecimento de uma série de anéis concêntricos em sua margem (circulii) (ORR, 1908; STORER, 2007). Estes anéis são muito utilizados em estudos de determinação de idade em peixes (CHUGUNOVA, 1963;

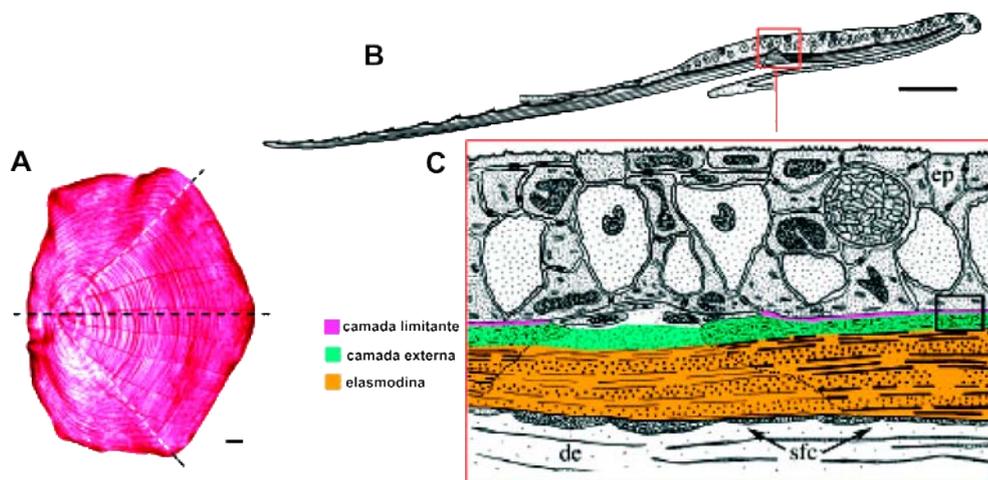
SANTOS & BARBIERI, 1993). Supostamente não há troca desse tegumento, embora ocasionalmente escamas possam ser perdidas e substituídas (STORER, 2007).

A estrutura da escama elasmóide foi descrita em diversas espécies pertencentes à linha dos actinoptergianos e sarcoptergianos (SIRE & AKIMENKO, 2004) e uma série de autores trabalharam com a organização estrutural da pele em peixes, e o desenvolvimento de escamas

(ABRAHAM et al., 2001; DE YUAN & CAMPANA, 1998; DOMINGUES & HAYASHI, 1998; GRIZZLE & THIYAGARAJAH, 1987; FUJIMOTO et al., 2008; KOUMANS & SIRE, 1996; LANGER et al., 2004; LYNNG et al., 2004; MITTAL & WHITEAR, 1979; MOSS, 1972; NOLAN et al., 2002; PANFILI et al., 2002; SIRE & AKIMENKO, 2004; SIRE et al., 1997; SOUZA & SANTOS, 1997; SOUZA et al., 2003a; SOUZA et al., 2003b; WATERMAN, 1970).

Em todas as espécies de actinoptergianos e sarcoptergianos descritas até o momento as escamas são compostas de três camadas presentes em todos os tipos chamadas de, da região mais inferior à mais superior: placa basal, camada externa e camada limitante (SIRE & AKIMENKO, 2004).

**Figura 3.1-A:** Escama de *Danio rerio* submetida à Vermelho de Alizarina. É possível notar as ondulações radiais da escama e as linhas pontilhadas brancas marcam o limite anterior do epitélio. A linha pontilhada preta marca o corte ilustrado na figura B. **B:** Corte longitudinal de escama. **C:** Detalhe da área delimitada na figura B mostrando a camada limitante, a camada externa e a camada de elasmódina. de: estroma da derme; ep: epiderme; sfc: células formadoras de escama. Barras de escala: 100µm. Fonte: Adaptado de SIRE & AKIMENKO (2004).

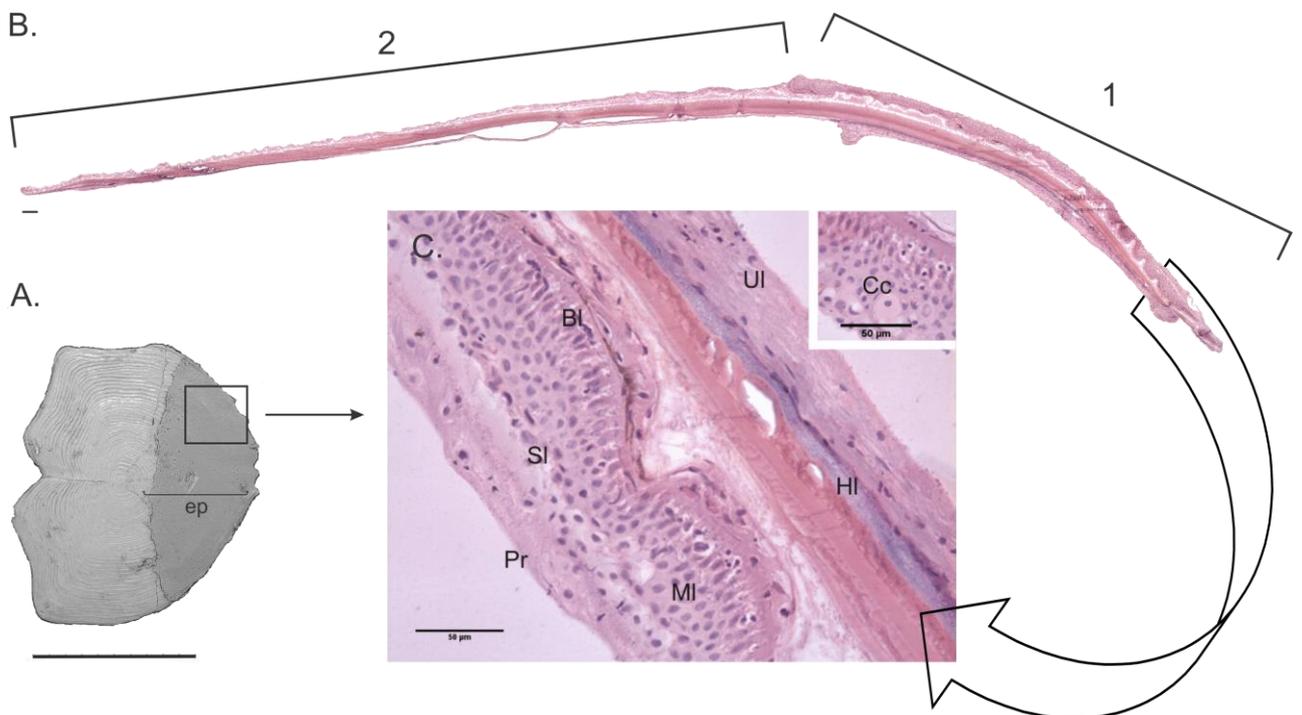


A placa basal é uma camada grossa de tecido incompletamente mineralizado composto de elasmódina e disposta como uma série de fibrilas de colágeno organizadas em uma estrutura semelhante a madeira compensada (MEUNIER *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004; SCHULTZE, 1996). A camada externa é fina, de tecido bem mineralizado composto de uma rede de fibrilas de colágeno entrelaçadas. Por fim, a camada limitante consiste em tecido hiper-

mineralizado desprovido de fibrilas de colágeno e depositado na superfície da escama, na região próxima da epiderme (SIRE & AKIMENKO, 2004) (Figura 3.1).

Estudos recentes fornecem uma descrição detalhada do epitélio da escama em *P. lineatus* (ALVES et al., 2013): estas são inteiramente cobertas por uma dobra epitelial desde o ponto de inserção no corpo do animal, até sua extremidade distal, tanto na superfície ventral, quanto na dorsal. Entretanto, a espessura do epitélio é irregular em ambas as superfícies, geralmente menor na porção distal, onde é possível ver apenas uma camada de células recobrendo a escama, e maior na porção proximal, onde constitui um epitélio estratificado. A porção ventral é recoberta também por um epitélio, mas este é formado por apenas uma camada de células na porção distal e está recoberto por uma camada indiferenciada na porção proximal (Figura 3.2).

**Figura 3.2-** Esquema da escama de *P. lineatus*. Em microscopia de varredura (A) é possível ver a porção espessa do epitélio (ep) na região proximal superior da escama e os circulii na porção restante. Barra de escala: 1 cm. Fonte: Elaborada pelo autor. Em corte longitudinal de escama submetida a H.E. (B) é possível ver a superfície dorsal e ventral recobertas por epitélio mais espesso na porção proximal (chave 1) e mais delgado na porção distal (chave 2). Barra de escala: 100  $\mu$ m. Fonte: Elaborada pelo autor. Em (C), detalhe do epitélio superior proximal estratificado à esquerda e epitélio inferior proximal à direita, de escama submetida à técnica de H.E.. BI: camada basal do epitélio superior; MI: camada média; SI: camada superficial; Pr: região de descamação; UI: camada indiferenciada; HI: camada hematoxilina-afim; Cc: célula club; seta fina: camada basal do epitélio inferior; chave: matriz colágena; cabeça de seta: camada limitante da escama; seta grossa: cromatóforo. Fonte: Adaptado de ALVES et al. (2013) e acrescido de imagens do próprio autor.



O epitélio proximal superior (i.e., da porção dorsal) é estratificado, com 2 a 5 camadas de células, e diferenciado, sendo as células mucosas e as células club os tipos mais comuns (ALVES et al., 2013). Já a porção distal da escama é coberta por uma única camada de células pavimentosas e a face ventral é coberta por um epitélio que pode ser dividido em duas camadas: uma externa e indiferenciada, e outra bastante delgada e adjacente ao colágeno da escama (ALVES et al., 2013) (Figura 3.2).

Por fim, a superfície dos epitélios em peixes que fica em contato com a água possui microcristas características (UEHARA et al., 1991), que são dobras na superfície dessas células (SPERRY & WASSERSUG, 1976) que formam um desenho na superfície da pele que se assemelha aos padrões de impressões digitais (UEHARA et al., 1991), muito visível sob microscopia eletrônica de varredura.

### **3.2. O uso de peixes e do tecido epitelial como bioindicadores**

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, detritos industriais ou residuais, derramamento de óleo, pesticidas ou outros agentes que podem afetar diretamente o ecossistema e por conseguinte, a sobrevivência das espécies; motivo pelo qual são modelos experimentais excelentes para Biologia Ambiental, Embriologia, Neuroendocrinologia (POWERS, 1989). Tanto que, os peixes são alguns dos principais organismos comumente utilizados na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos (GOULART & CALISTO, 2003).

Entre os métodos de estudo que se pode utilizar para avaliação de impactos ambientais a análise das mudanças morfológicas constitui uma ferramenta eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações quase letais (ROMÃO et al., 2006). E técnicas histológicas são muito utilizadas para avaliação dos impactos ambientais, pois permitem a análise de órgãos-alvo afim de detectar os efeitos e lesões de agentes contaminantes (SANTANA, 2004; SCHWAIGER et al., 1997).

Diversos órgãos-alvo podem ser analisados por meio dessas técnicas, entre eles a pele e as brânquias. A pele é o maior órgão dos vertebrados e atua nas interações entre o indivíduo e o ambiente já que a maioria das informações de pressão e temperatura são capturadas nesse órgão e grande parte das informações de odor em animais aquáticos são também processadas nele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Assim, se trata de uma superfície de contato direto com o meio aquático (LYNG et al., 2004; SOUZA & SANTOS, 1997), que recebe estímulos e responde a alterações (SOUZA & SANTOS, 1997). Portanto, a integridade da pele é responsável pelo bem estar dessas interações, e conseqüentemente, pelo bem estar do animal.

Numerosas características do tecido epitelial em peixes são responsáveis pelo potencial para estudos toxicológicos, como a presença de células mucosas, que são a primeira linha de defesa dos peixes contra metais pesados (COELLO & KHAN, 1996) e presença de células club, relacionadas às respostas a contaminantes (BROWN, 2003; CHIVERS et al., 2007; IGER et al., 1994a; IGER et al., 1994b; HALBGEWACHS et al., 2009; MCPHERSON et al., 2004; ZACCONE et al., 2001).

As células club são glândulas epidérmicas unicelulares, características de diversas ordens de peixe e provavelmente multifuncionais (ZACCONE et al., 2001). Dentre as funções que lhe foram atribuídas na literatura verifica-se a produção de feromônios liberados em resposta a agentes tóxicos e estressantes (BROWN, 2003; PFEIFFER, 1977; SMITH, 1992; ZACCONE et al., 2001) e resposta a lesões mecânicas (CHIVERS et al., 2007).

Recentemente foi sugerido que essas células, cuja função primária acreditava-se ser a liberação de substâncias de alarme na presença de predadores, surgiram com função protetora para a camada epidermal da pele e adquiriram secundariamente o papel ecológico de resposta de alarme (CHIVERS et al., 2007). Portanto, as células foram mantidas por seleção natural devido aos benefícios da proteção, não pela função sinalizadora (CHIVERS et al., 2007) e há motivos para acreditar que a presença dessas células possa servir como bioindicador.

Devido a estas e outras características, diversos autores trabalharam com o efeito de contaminantes na pele de espécies de peixes (DOWLING & MOTHERSILL, 2001; FUJIMOTO et al., 2008; KILEMADE & MOTHERSILL, 2000; LANGER et al., 2004; PRETTI et al., 2006; RAJAN & BANERJEE, 1991; PROSSER et al., 1947).

Há um esforço no sentido de padronizar as técnicas de coleta, manipulação, preservação e procedimentos laboratoriais para monitoramento ambiental a partir de análises histopatológicas de forma geral e as mudanças na pele já foram bastante exploradas e podem ser classificadas em 5 categorias diferentes: (1) distúrbios circulatórios, que incluem hemorragia, hiperemia, aneurismas e formação de edemas intercelulares; (2) mudanças regressivas, que incluem mudanças estruturais, alterações de plasma, formação de depósitos citoplasmáticos [cuja composição deve depender do contaminante em questão], alterações nucleares, atrofia e necrose na epiderme e derme e defeitos na membrana basal; (3) mudanças progressivas, que incluem hipertrofia e hiperplasia na epiderme e derme e hiperplasia de células de muco na epiderme; (4) Inflamação, que inclui a formação de exsudato, ativação do retículo endoplasmático e infiltração; e (5) Tumores, que incluem formação de tumores benignos e malignos (BERNET et al., 1999).

Numerosos autores também exploraram o potencial das escamas como bioindicadores, apontando sua propriedade de acumular metais pesados e aplicação em estudos toxicológicos (ABDULLAH et al., 1976; BURGER et al., 2013; CLEARWATER, FARAG & MEYER, 2002; COELLO & KHAN, 1996; HOGSTRAND & WOOD, 1998; LAKE et al., 2006; MUGIYA, HAKOMORI & HATSUTORI, 1991; RASHED, 2001; SAUER & WATABE, 1989).

Alguns trabalhos estudam a expressão gênica (QUIRÓS et al., 2007) e outros avaliam efeitos morfológicos nos ornamentos e calcificação das escamas (DUA & GUPTA, 2005; RISHI & JAIN, 1998; JOHAN & DUA, 1994; SAUER & WATABE, 1984; SUZUKI et al., 2004). Entretanto, faltam estudos que utilizem procedimentos não-invasivos para realizar análises morfológicas.

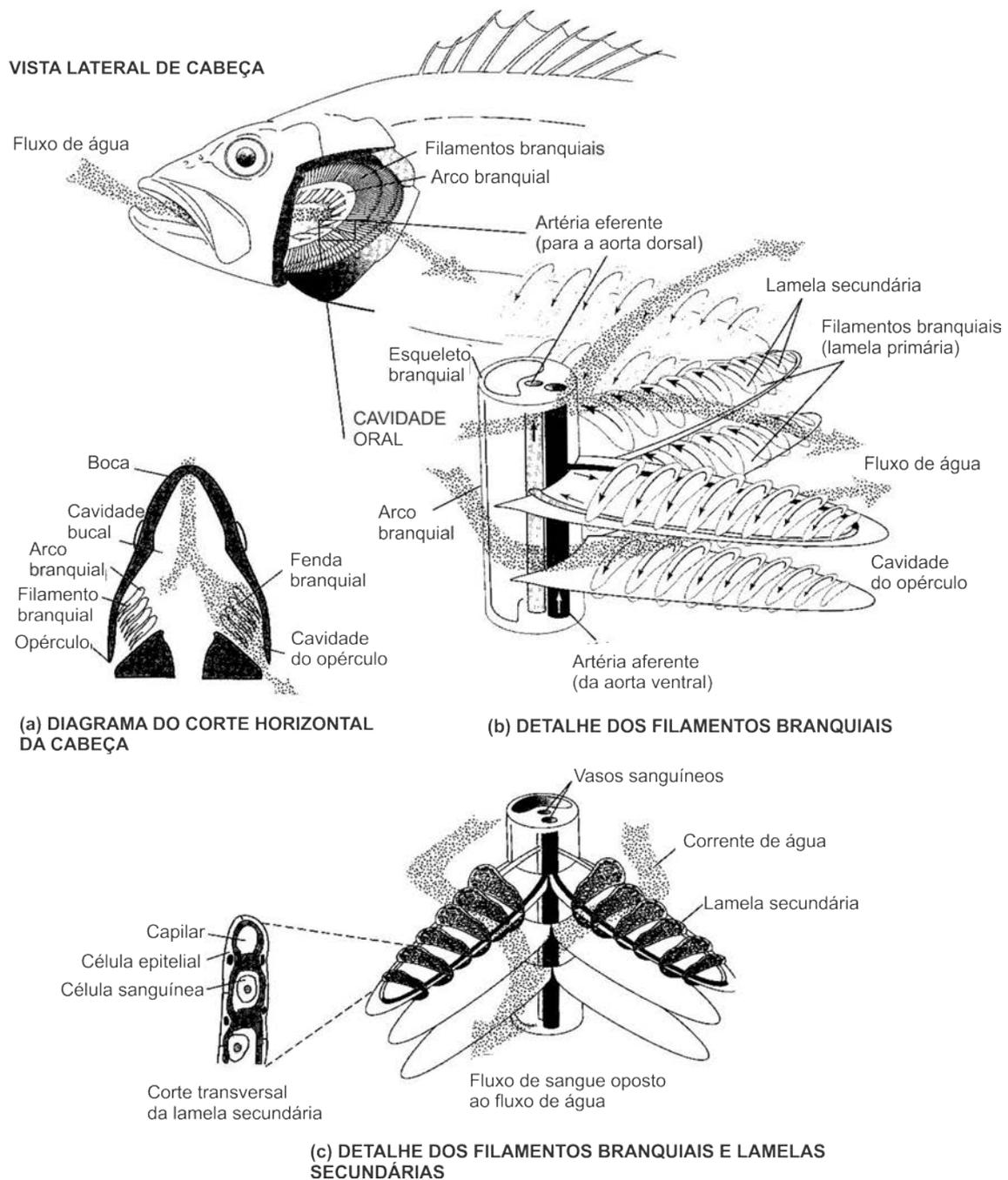
As microcristas também tem potencial como parâmetro de avaliação. Acredita-se que essas dobras da superfície do epitélio são predominantemente funcionais, pois são observadas não apenas na pele de peixes, mas em tecidos mucosos de outros vertebrados (UEHARA et al., 1991). Essas estruturas são mantidas por citoesqueleto (UEHARA et al., 1991) e alguns autores propõe que sua função seja mecânica, mantendo uma camada de muco produzido por outras células sobre a superfície do epitélio (SPERRY & WASSERSUG, 1976). Assim, efeitos nessas estruturas possivelmente causados por contaminantes, poderiam afetar a capacidade de manter o muco sobre a pele, e conseqüentemente afetar a capacidade de proteção dos peixes.

### **3.3. O uso das brânquias como indicadores**

A maioria dos vertebrados aquáticos possui brânquias, que são estruturas especializadas nas trocas gasosas e em peixes estão posicionadas nas bolsas faríngeas (POUGH et al., 2008). Em teleósteos elas estão posicionadas em cinco pares de arcos branquiais formados pelos filamentos branquiais que, por sua vez, portam as lamelas secundárias (JOBBLING, 1995). As lamelas secundárias estão em ângulo reto em relação ao eixo do filamento e representam a superfície funcional respiratória pela qual o oxigênio é absorvido e difundido para o sangue (JOBBLING, 1995) (Figura 3.3)

Brânquias são permeáveis ao oxigênio, dióxido de carbono e também à água e como resultado, a maioria dos movimentos da água e dos íons ocorre através de sua superfície; esse fluxo de água é geralmente unidirecional – entrando pela boca e saindo pelas brânquias e o arranjo vascular maximiza a troca de oxigênio (POUGH et al., 2008). Cada filamento branquial possui duas artérias, um vaso aferente que vai do arco branquial até a ponta do filamento e um vaso eferente que retorna o sangue para o arco (POUGH et al., 2008).

**Figura 3.3-** Anatomia das brânquias de peixes teleósteos. (a) Posição das brânquias na cabeça e o fluxo geral da água; (b) fluxo da água (setas grandes e pontilhadas) e do sangue (setas pequenas e pretas) pelas brânquias; e (c) direção do fluxo de água na brânquia oposto ao fluxo de sangue na lamela secundária. Células sanguíneas separadas da água rica em oxigênio, somente por células epiteliais finas e pela parede capilar em corte transversal da lamela secundária. Fonte: Adaptado de POUGH et al, 2008.



Revestindo o arco branquial, os rastros, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares há o epitélio branquial; um tecido estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo células pavimentosas, células pilares, células secretoras de muco e células ricas em mitocôndria, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas

(MACHADO, 1999). O arranjo dessas células pilares é que permite a formação dos canais pelos quais o sangue circula para realizar as trocas gasosas; Esses canais, entretanto, não são constituídos por endotélios verdadeiros, apenas por prolongamentos citoplasmáticos das células pilares (MACHADO, 1999).

A brânquia é um órgão multifuncional e flexível que permite a sobrevivência em ambientes diversos e flutuantes (LAURENT & PERRY, 1991). Além de ser o principal local de trocas gasosas, também está envolvida nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (POUGH et al., 2008 e conseqüentemente, alterações em sua estrutura afetam uma miríade de funções fisiológicas.

Adaptações às mudanças ambientais podem envolver componentes morfológicos ou ter conseqüências morfológicas que fazem com que o peixe alcance um estado no qual a função branquial é total ou parcialmente conservada e muitos são os agentes físicos, químicos e inclusive patogênicos que podem desencadear esses processos (LAURENT & PERRY, 1991). As mudanças morfológicas podem ser consideradas adaptativas ou destrutivas, essas últimas sendo aquelas que resultam de desequilíbrio progressivo e incluem os efeitos de contaminantes; Entretanto, frequentemente é difícil distinguir esses dois tipos de alterações e o resultado de uma modificação morfológica conserva uma função branquial em detrimento de outra (LAURENT & PERRY, 1991).

O grau de alteração em órgãos como as brânquias pode ser relacionado a diferentes poluentes, suas concentrações e rotas de incorporação (ARELLANO et al., 2001) e por este motivo as alterações histopatológicas são amplamente utilizadas como biomarcadores ambientais em peixes, tanto em estudos de laboratório quanto *in situ* (PAULINO, 2011; REDDY & RAWAT, 2013).

Entre os tipos de alterações morfológicas comumente observadas em estudos de toxicidade estão os edemas, hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, proliferação e hipersecreção de células mucosas e de células ricas em mitocôndria (LEONARDO et al., 2001; MACHADO, 1999; MALLATT, 1985; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Da mesma forma que as mudanças na pele, essas mudanças nas brânquias podem ser classificadas em 5 categorias diferentes: (1) distúrbios circulatórios, que incluem hemorragia, hiperemia e aneurismas; (2) mudanças regressivas, que incluem mudanças estruturais, alterações de plasma, formação de depósitos citoplasmáticos [cuja composição deve depender do contaminante em questão], alterações nucleares, atrofia e necrose no epitélio e tecido conjuntivo branquiais; (3) mudanças progressivas, que incluem hipertrofia e hiperplasia dos

tecidos epitelial e conjuntivo; (4) inflamação, que inclui a formação de exsudato, ativação de RES e infiltração; e (5) tumores, que incluem formação de tumores benignos e malignos (BERNET et al., 1999).

Alterações estruturais nas brânquias de peixes, inclusive da espécie *P. lineatus*, já foram observadas em resposta a diversos outros agentes contaminantes por outros autores

(ARELLANO et al., 2001; CAZENAVE et al., 2009; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002; BERNET et al., 1999; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; ELAHEE & BHAGWANT, 2007; MARTINEZ et al., 2004; MAZON et al., 2002; PEREIRA, 2014; PEREIRA et al., 2012a; ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002; SIMONATO et al., 2008).

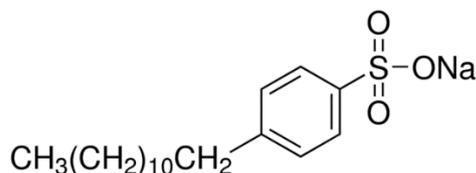
Camargo & Martinez (2007) registram a presença de anomalias como dilatação do canal marginal, hiperplasia de células epiteliais e descolamento do epitélio lamelar em espécimes de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* em rios urbanos poluídos. Neste contexto, a análise das mudanças morfológicas constitui uma ferramenta confiável e eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações (ROMÃO et al 2006).

### 3.4. Detergentes biodegradáveis

Sabões e detergentes são compostos de moléculas que contêm grandes grupos hidrocarbônicos, os grupos hidrofóbicos, e um ou mais grupos polares, os grupos hidrofílicos. As partes não polares de tais moléculas dissolvem-se em gorduras e óleos e as porções polares são solúveis em água (ALLINGER et al., 1978).

A indústria de detergentes sintéticos baseia-se nos alquil-benzenos, mais especificamente os alquil-benzeno sulfonatos lineares (LAS), que foram introduzidos pelas indústrias no mercado em 1964 como substitutos de rápida degradação para os alquil-benzeno sulfonatos altamente ramificados (ABS) e representam um dos surfactantes aniônicos mais utilizados do mercado (HERA, 2009).

Os produtos a base desse composto são considerados detergentes brandos, por possuírem uma cadeia lateral linear alifática e serem biodegradáveis, ou seja, por serem metabolizados por bactérias nas estações de tratamento de esgotos (ALLINGER et al., 1978) (Figura 3.4). No entanto, da maneira que tem sido utilizados atualmente, os detergentes têm sido alvo de críticas, não apenas devido ao problema da biodegradação, mas também porque quando as águas contaminadas são despejadas em rios e lagos, o detergente é responsável pelo fenômeno de eutrofização (ALLINGER et al., 1978).

**Figura 3.4-** Fórmula estrutural do LAS. Fonte: Sigma-Aldrich®

O elevado teor de fosfato, que aumenta a eficiência na limpeza, é responsável pelo aumento do conteúdo de nutrientes das águas, por sua vez, aumenta a velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninhas e faz com que o teor de oxigênio disponível nas águas diminua, com efeitos graves sobre a vida animal (ALLINGER et al., 1978).

Houve grande expansão do uso de detergentes sintéticos para uso doméstico na década de 1940, de forma que os países europeus voltaram grande atenção para os efeitos destes compostos em peixes devido à espuma e grande mortalidade observadas (HENDERSON et al., 1959).

Mungray & Kumar (2008) discorreram sobre as concentrações desse surfactante frequentemente encontradas em corpos d'água: em amostras de água que passaram por estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas anaeróbias a concentração de LAS alcança de 3,6 a 4,9 mg/L, à medida que em duas amostras de água que passaram por estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas de oxidação essa concentração atingiu 3,31 e 0,61 mg/L. Em contrapartida, em corpos d'água movimentados, como rios, as concentrações de LAS variaram de 0,36 a 0,49 mg/L em locais que recebiam efluentes de estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas anaeróbias, e 0,31 e 0,06 mg/L em corpos que recebiam efluentes de estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas de oxidação (MUNGRAY & KUMAR, 2009). Desta forma, segundo o mesmo autor, concentrações de LAS são encontradas em corpos de água mesmo quando os efluentes são submetidos a diferentes processos de tratamento de esgoto.

Os dados sobre a ecotoxicidade aquática de LAS são ricos e o tema é bem documentado. Os níveis tóxicos para algumas espécies de peixe giram em torno de 3,2 (*Pimephales macrichirus*) e 4,1 mg/L (*P. promelas*) quando da exposição aguda, e 0,25 (*Tilapia mossambica*), 0,34 (*Onchorhynchus mykiss*), 0,87 (*P. promelas*), 2,3 (*Brachydanio rerio*) e 3,2 mg/L (*Poecilia reticulata*) quando da exposição crônica por pelo menos 21 dias (HERA, 2009) Os efeitos registrados afetam a mortalidade e a reprodução dos animais e ao final, a concentração máxima padrão na qual não há efeitos sobre animais aquáticos foi estabelecida

como 0,27 mg/L (HERA, 2009; MUNGRAY & KUMAR, 2009). Entretanto, até o momento, pouco se sabe de seus efeitos em animais de regiões neotropicais.

### 3.5. Depressão alimentar

Mudanças na qualidade da água afetam todos os níveis de organização biológica e há uma grande variedade de níveis nos quais os indicadores de estresse podem se basear; Entretanto, bioindicadores frequentemente são baseados em mudanças à nível de comunidade (em sua estrutura) ou em respostas a nível subindividual, por meio da análise isolada de tecidos, órgãos ou sistemas de um indivíduo, utilizando parâmetros moleculares ou fisiológicos (MALTBY, 1994). Se buscamos compreender as implicações que mudanças a nível subindividual, em parâmetros bioquímicos ou fisiológicos, tem sobre a estrutura da comunidade, precisamos relacionar efeitos em diferentes níveis de organização biológica (MALTBY, 1994).

Indicadores de estresse baseados em fisiologia da energia tem potencial de integrar respostas em diversos níveis, uma vez que incluem medidas como a taxa de ingestão, excreção, respiração e produção de energia que compõem o balanço geral do organismo (MALTBY, 1994). A importância deste balanço atravessa níveis individuais e populacionais, pois a aquisição de energia via consumo alimentar e sua alocação determinam a taxa de desenvolvimento, crescimento, fecundidade e sobrevivência, todos componentes importantes do *fitness* e determinantes da estrutura e dinâmica da população (MALTBY, 1994).

A par desta cascata de efeitos, a depressão alimentar provoca também danos diretos e imediatos em parâmetros funcionais do ecossistema, tais como a decomposição da matéria orgânica, no caso dos detritívoros, ou a herbivoria, no caso dos consumidores primários e portanto, constitui um exemplo de parâmetro com inequívoca relevância ecológica (AGOSTINHO et al., 2012) que pode gerar impactos negativos tardios em níveis de organização biológica sucessivamente superiores (MOREIRA et al., 2006).

A diminuição do consumo de alimento ou depressão alimentar parece ser uma resposta geral à exposição a contaminantes (MCWILLIAM & BAIRD, 2002). Diversos autores demonstram efeitos de toxicidade sobre a taxa alimentar durante ou após a exposição, tanto em laboratório como *in situ*, e com invertebrados (KRELL et al., 2011; LOPES et al., 2007, 2011; MCWILLIAM & BAIRD, 2002; MOREIRA et al., 2005, 2006; MOREIRA-SANTOS, 2005; SOARES et al., 2005), ou com peixes (CASTRO et al., 2004; MOREIRA et al., 2010)

Assim, a possibilidade de correlacionar efeitos histológicos que refletem alterações morfo e fisiológicas a nível subindividual a parâmetros ecologicamente relevantes, como a taxa de alimentação, permite uma compreensão das conseqüências da exposição a contaminantes em

diversos níveis como é tão necessário para estudos ecotoxicológicos (ANDERSON et al., 1994; MALTBY, 1994).

### 3.6. *Prochilodus lineatus*

Gêneros da família Prochilodontidae são muito importantes na pesca comercial e de subsistência (REIS et al., 2003), principalmente nas bacias do sudeste do país. Eles podem ser facilmente distinguidos dos outros peixes, exceto quando larvas, pelos seus lábios carnosos e equipados com duas séries de denticulos relativamente pequenos, falciformes e móveis (REIS et al., 2003). São peixes de tamanho moderado a grande, robustos, com escamas relativamente grandes; a nadadeira dorsal é precedida por um espinho prostrado, que no gênero *Prochilodus* é bifurcado (REIS et al., 2003) (Figura 3.5).

Prochilodontídeos são limitados à América do Sul e principalmente a leste dos Andes, ocorrem nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, Tocantins e da Prata, nos rios costeiros das Guianas, no rio São Francisco e outros rios costeiros do leste do Brasil, e na porção norte da bacia da Lagoa dos Patos, no Sul do Brasil; sendo que apenas uma espécie ocorre a oeste dos Andes, na Colômbia (REIS et al., 2003).

**Figura 3.5-** Espécime juvenil de *P. lineatus*. Fonte: Elaborada pelo autor

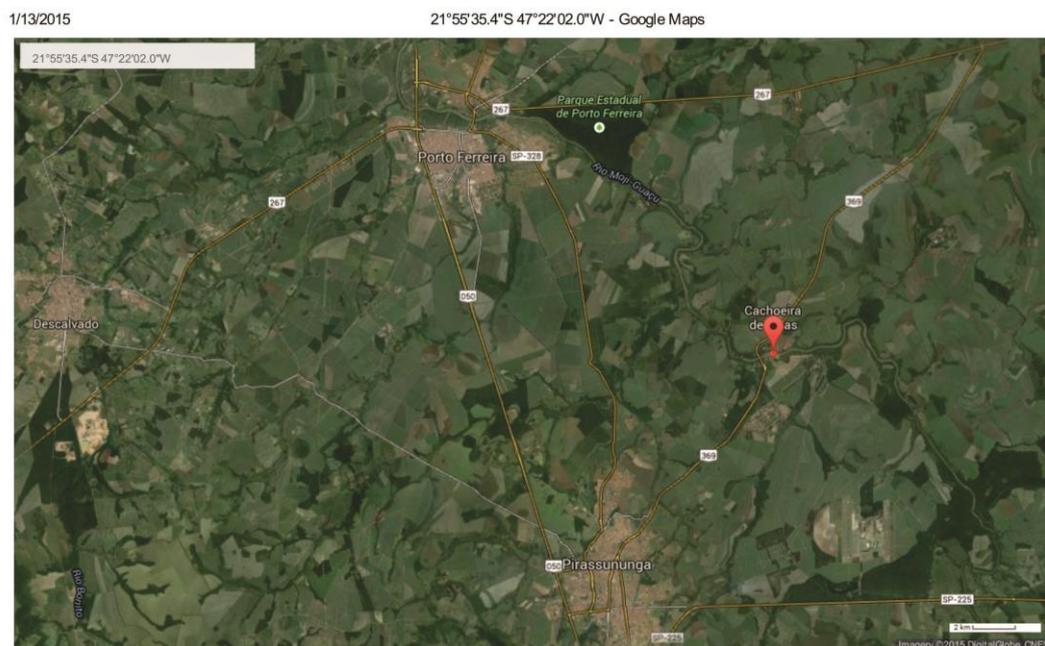
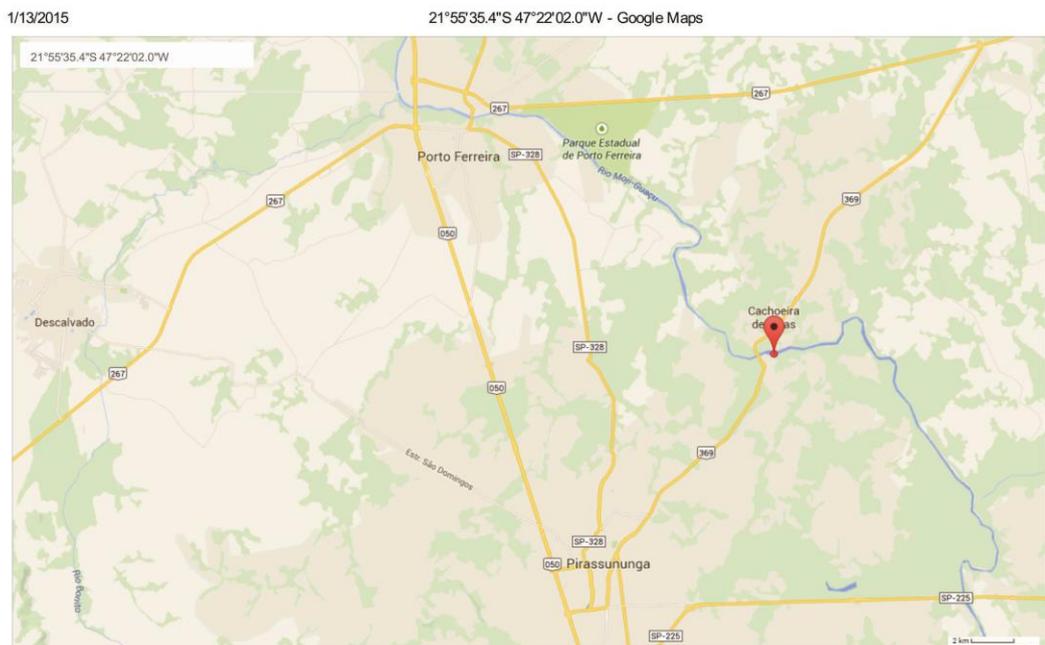


Nessa família, todos os gêneros exploram detritos em superfícies subaquáticas e como consequência desse hábito alimentar e de suas grandes populações, esses peixes possuem um papel significativo no fluxo de energia nos sistemas aquáticos que habitam (REIS et al., 2003). Assim, a família caracteriza-se pela iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), também reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema (REIS et al., 2003).

Entre suas espécies, os curimatás (*Prochilodus lineatus*) são prolíficos, de crescimento rápido e elevada rusticidade, o que os torna propícios para o cultivo (BRITSKI, 1972). Sua

biologia reprodutiva é muito bem documentada (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009). A espécie migra de 150 a 500 quilômetros abaixo da Cachoeira de Emas (Pirassununga, SP, Brasil - 21° 55' 35.37" S, 47° 22' 02.023" W) (Figura 3.6), passa pela cachoeira duas vezes ao ano, entre outubro e dezembro durante a piracema, e entre janeiro e fevereiro durante a descida (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009; TOLEDO-FILHO et al., 1986). As maiores velocidades atingidas são 220 km/mês em outubro (piracema) e 200 km/mês em janeiro (descida) (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009).

**Figura 3.6-** Mapa da região entre as cidades de Pirassununga e Porto Ferreira, SP, por onde corre o Rio Mogi-Guaçu e onde se situa a Cachoeira de Emas (marcação vermelha). Fonte: Google Maps®



A espécie alimenta-se principalmente de sedimentos inorgânicos (52.8% dos itens alimentares), detritos orgânicos, algas, testáceos e nemátodos (FUGI, HANH & AGOSTINHO, 1996) e o pico de alimentação desses animais varia entre 3 e 9 horas após o nascer do sol (FUGI, HANH & AGOSTINHO, 1996).

Uma das estratégias de peixes para sobreviver em condições adversas ou à superexploração é reduzir a idade da primeira maturação e a espécie *P. lineatus* adotou essa estratégia no Rio Mogi-Guaçu (Bom Repouso, MG, Brasil – Morro Agudo, SP, Brasil) (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009). Recentemente chega a maturidade em um ano ao invés de dois ou três (fêmeas e machos respectivamente) (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009).

Espécies do gênero *Prochilodus* são comumente utilizadas em pesquisa e a espécie *P. lineatus* da bacia do Rio Mogi-Guaçu representa grande parte da biomassa da bacia desse rio (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009). Essa espécie é alvo de inúmeros estudos de toxicidade

(CERQUEIRA & FERNANDES, 2002; MARTINEZ & SOUZA, 2002; MARTINEZ et al., 2004; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MADUENHO ET AL., 2007; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; PEREIRA & CAETANO, 2009; SIMONATO et al., 2008).

Dos autores citados acima, FERNANDES, M. N. e MARTINEZ, C.B.R. possuem extensa literatura além dos trabalhos já citados sobre contaminação em espécies de *Prochilodus*.

Atualmente a população dessa espécie encontra-se em equilíbrio no Rio Mogi-Guaçu, sem sofrer reduções drásticas; a ausência de um número significativo de barragens hidrelétricas no rio Mogi Guaçu, associada ao alto grau de depuração favorecem a sobrevivência, pois permitem a adoção de estratégias de sobrevivência pelos peixes e, apesar da intensa sobrepesca e do aumento gradativo de poluição doméstica, industrial e agrícola verificado nos últimos 50 anos, a população se mantém (BARBIERI et al., 2004).

As estratégias de sobrevivência tem plasticidade biológica limitada e, se medidas urgentes não são tomadas, as populações podem atingir um ponto de equilíbrio instável, e serem dizimadas ou sua exploração pode se tornar economicamente, inviável (BARBIERI et al., 2004). Por isto, nada impede a necessidade de políticas de manejo para a prevenção da extinção ou declínio da população abaixo dos níveis de interesse para a pesca comercial como já ocorreu em outras bacias como a do rio Sorocaba e Piracicaba no Estado de São Paulo (BARBIERI et al., 2004; MESCHIATTI & ARCIFA, 2009).

Portanto, a espécie claramente apresenta grande potencial como modelo para ambientes neotropicais e como já citado anteriormente os dados sobre a ecotoxicidade aquática de LAS

são ricos e o tema é bem documentado no hemisfério norte (HERA, 2009). Entretanto, faltam estudos com modelos neotropicais apropriados.

#### 4. Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) campus de Rio Claro, SP, Brasil.

##### 4.1. Material

Para realizar o projeto proposto foram utilizados 192 indivíduos da espécie *P. lineatus* no mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que 72 destes foram utilizados para cada repetição dos experimentos que requerem sacrifício e 12 destes foram utilizados para cada repetição dos experimentos não-invasivos. Os espécimes foram obtidos na Piscicultura Polettini em Mogi Mirim, SP, Brasil.

Antes dos experimentos os peixes foram mantidos em caixas de polietileno com capacidade de 310 litros cada equipadas com filtro UV para prevenir eventuais contaminações, filtros convencionais, aquecedores para manter a temperatura e fundo composto de areia para adequar o ambiente, visto que os peixes são de fundo e raspadores (Figura 4.1).

**Figura 4.1**-Tanque de polietileno de 310 litros equipado. Fonte: Elaborada pelo autor.



O estudo foi composto por dois experimentos, um que requeria sacrifício dos animais para coleta de brânquias; e um experimento apenas com amostragens não-invasivas, no qual houve coleta de escamas e quantificação da taxa de alimentação. Entretanto, para facilitar as comparações estatísticas entre os dados dos experimentos letais e não-invasivos, escamas foram coletadas em ambos.

Para os experimentos que demandavam sacrifício os peixes foram mantidos em caixas de polietileno de 310 litros. Foram propostos 3 grupos experimentais no projeto, dois com concentrações diferentes do surfactante LAS adquirido junto à Sigma-Aldrich® (código 289957) e um grupo controle. Cada caixa conteve um grupo experimental diferente e cada grupo foi constituído por 24 indivíduos. Portanto, foram utilizados 144 indivíduos em experimentos letais. As caixas foram aeradas constantemente, por bombas de água individuais e todo o equipamento apresentava fabricação e capacidade idênticas.

Os peixes utilizados para os experimentos que não requeriam sacrifício foram mantidos em aquários de vidro individualizados de 25 litros durante o período experimental, que também foram equipados com filtros convencionais, bombas para aeração e aquecedores, todos com a mesma capacidade e mesmo fabricante. Os aquários foram recobertos e tampados com cartolina branca para evitar exposição dos peixes ao ambiente externo e estresse e não tiveram o fundo arenoso para que não houvesse interferência nas medidas de taxa alimentar (Figura 4.2). Os aquários receberam as mesmas concentrações de LAS que as caixas de polietileno descritas no parágrafo anterior e nos experimentos foram utilizados 12 aquários no total. O experimento envolveu dois grupos expostos a concentrações diferentes de LAS e um grupo controle, como nos experimentos letais. Em cada repetição do experimento não-letal foi utilizado 4 aquários por grupo experimental e cada aquário conteve 1 peixe, de maneira que 4 indivíduos foram amostrados por grupo experimental em cada coleta e em cada repetição.

**Figura 4.2-** Aquários equipados e revestidos. Fonte: Elaborada pelo autor.



Sabemos, com base em experimentos realizados anteriormente, que existe perda de cerca de 10 litros de água por semana em cada caixa de polietileno (*informação pessoal*),

portanto, semanalmente a água perdida foi repostada e as concentrações foram reajustadas proporcionalmente ao volume perdido. Por outro lado, a concentração de surfactante nos aquários foi repostada diariamente, devido às baixas concentrações de LAS que dissipam rapidamente mesmo em corpos de água pequenos.

Para avaliar a real concentração de LAS nas águas utilizadas para experimentação, as mesmas foram submetidas a análises químicas como descrito no item “4.2 – a”.

Para o processamento do material para as análises histoquímicas e histológicas foram utilizadas as instalações do Laboratório de Histologia da UNESP - Rio Claro, SP, Brasil e microscópio Leica CM 2000 provido de câmera para captura de imagens. Para o processamento do material para as análises ultraestruturais foram utilizadas as instalações do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP – Rio Claro, SP, Brasil e o microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

## **4.2. Métodos**

### **a) Amostragem e Tratamentos**

Os experimentos começaram assim que os espécimes em estágio juvenil se encontravam com tamanho adequado, entre 7 e 10 centímetros de comprimento aproximadamente. Os indivíduos utilizados se encontravam em estágio juvenil, portanto não foi possível identificar machos e fêmeas em todas as coletas. Entretanto, encontramos machos e fêmeas nos experimentos letais após o sacrifício. Todos os indivíduos foram aclimatados em seus respectivos locais por duas semanas antes que cada repetição do experimento começasse e antes de cada coleta todos os animais foram submetidos a jejum de 48 horas nos experimentos letais e 24 horas nos experimentos não-invasivos.

O experimento letal foi repetido duas vezes e o experimental não-invasivo foi repetido quatro vezes, para que as médias dos parâmetros medidos se mantivessem o mais estável possível nos indivíduos do mesmo tempo de coleta e para que se obtivesse um número amostral adequado.

Em todos os experimentos os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: O grupo Controle foi exposto à água do poço artesiano da UNESP – Rio Claro, SP, tratada com cloro, afim de eliminar eventuais contaminações, porque a água clorada é a única disponível no Campus para o experimento. Entretanto, essa água foi oxigenada por uma semana antes do início do experimento para baixar o nível do cloro. O Tratamento 1 foi exposto a uma diluição de 0,36 mg/L de LAS e o Tratamento 2 foi exposto a uma diluição de 3,6 mg/L de LAS, pois

segundo Mungray & Kumar (2009), as concentrações desse surfactante giram em torno de 0,36 a 0,49 mg/L em águas de rios que recebem efluentes de estações de tratamento de esgoto, e 3,6 a 4,9 mg/L em efluentes de estações de tratamento de esgoto. Além disso, o estudo pretendeu detectar alterações morfológicas devido à exposição por longos períodos já em níveis baixos do contaminante.

Depois do período de duas semanas de aclimação os experimentos começaram e 3 coletas foram realizadas, em 14, 21 e 30 dias de tratamento, visando detectar efeitos de exposição prolongada e seguindo períodos de exposição já praticados por outros autores (HERA, 2009).

As escamas foram removidas da mesma região do corpo em todos os animais amostrados em um esforço de padronizar o tamanho das escamas coletadas. Sempre foram coletadas da porção posterior do corpo, pois é uma região na qual não há muita perda de escamas uma vez que juvenis não perdem escamas frequentemente e mesmo em adultos a perda é maior acima da linha lateral (MCCART, 1967), logo o risco de obter escamas regeneradas é menor. Os fragmentos de brânquia foram sempre coletados pela abertura do opérculo (Figura 4.3). Após coleta de escamas nos indivíduos do experimento de métodos não-invasivos, a área de onde as escamas foram removidas foi tratada com iodo para evitar infecções e auxiliar na cicatrização.

**Figura 4.3-** Indivíduo juvenil de *P. lineatus*. As brânquias foram removidas pela abertura do opérculo, evidenciada na foto pela pinça que levanta o opérculo, e as escamas foram removidas da região apontada pela seta. Fonte: Elaborada pelo autor.



Nos experimentos não-letais os indivíduos foram alimentados com uma ração em disco para peixes de fundo (Tetra Veggie algae wafer, produzida pela Tetra®), cuja constituição facilitou a medida da taxa de alimentação. Nos experimentos letais os espécimes foram alimentados com uma ração diferente (Poytara Disco, produzida pela Poytara®) daquela utilizada nos experimentos letais devido ao alto custo da primeira. Ambas as rações são próprias para peixes neotropicais e fornecem uma dieta equivalente.

Para os animais do experimento letal, antes dos mesmos serem sacrificados eles foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico, para cada 100 mL de água deionizada), conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, processo nº 031/2012.

Como alguns componentes da água podem afetar a morfologia celular e outros parâmetros biológicos, para avaliação de toxicidade foram realizadas análises químicas das águas utilizadas nos dois tratamentos e no grupo Controle, segundo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil. Com isto pretendeu-se identificar quais compostos químicos estavam presentes na água utilizada e, através da comparação com trabalhos realizados na área, apontar quais elementos podem ter interagido com o surfactante.

A determinação de metais se deu por ICP-AES para os seguintes elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $ClO_2^-$ , acetato e oxalato, e os cátions Li, Na,  $NH_4^+$  e K, foram determinados por Cromatografia Iônica. Por fim, foram realizadas as análises de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Para determinar a concentração real de LAS nas águas testadas amostras de cada tratamento foram colhidas após as coletas e submetidas a análises cromatográficas em uma HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos, SP, Brasil.

#### **b) Protocolos para análises histológicas e histoquímicas**

Para as análises histológicas e histoquímicas foram amostrados oito indivíduos por grupo em cada coleta letal e quatro indivíduos por grupo em cada coleta não-invasiva. Nos experimentos letais foram coletadas brânquias de seis indivíduos e nos experimentos não-letais, apenas escamas – de 10 a 20 escamas. As amostras foram fixadas em Bouin aquoso e formaldeído 10%, descalcificadas em EDTA 10% (apenas as escamas), desidratadas em álcool, embebidas e emblocadas em historesina.

As lâminas de escama do experimento letal foram confeccionadas e submetidas às técnicas de PAS para a detecção de polissacarídeos neutros, hematoxilina-eosina para analisar possíveis alterações morfológicas nas células, picrossirus red para a detecção de fibras colágenas, Feulgen para análise da morfologia nuclear e azul de toluidina para a detecção de regiões ácidas.

As técnicas de picrossirius red, azul de toluidina e Feulgen só puderam ser qualitativamente analisadas e foram realizadas apenas nas escamas coletadas no experimento letal, devido ao grande volume de amostras que foi coletado. As lâminas de brânquia foram submetidas apenas à técnica de hematoxilina-eosina, também devido ao grande volume de amostras a serem coletadas e processadas.

Nos experimentos não-invasivos ênfase foi dada apenas às técnicas que podem ser quantificadas, portanto as lâminas de escama do experimento não-invasivo foram confeccionadas e coradas com as técnicas de PAS para a detecção de polissacarídeos neutros e hematoxilina-eosina para analisar possíveis alterações morfológicas nas células.

Todo o material foi montado em Entellan, analisado e fotografado com auxílio de um microscópio de luz Leica CM 2000 com câmera Leica DFC280. Os protocolos das técnicas já referidas são descritos abaixo:

- PAS (Ácido Periódico e Schiff): Segundo Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, que podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica as lâminas são imersas em Ácido Periódico 0,4% por 10 minutos, lavadas em água destilada, colocadas para reagir com o Reativo de Schiff por 1 hora no escuro, lavadas em 3 banhos de 1 minuto em água sulfurosa e lavadas em água corrente por 10 minutos.
- Hematoxilina-eosina: Segundo Paulete & Beçak (1976), a técnica é composta de dois reagentes principais, a Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo da célula de azul, e a Eosina, de características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Na realização da técnica, as lâminas são deixadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas com Hematoxilina por 5 minutos, reagem com água por 4 minutos, são lavadas em água corrente, coradas com Eosina por 5 minutos e lavadas em água corrente.
- Picrossirius red: Segundo Pearse (1985), a técnica é utilizada para diferenciar fibras colágenas do tipo I, de fibras colágenas do tipo III. O colágeno tipo I é evidenciado por coloração vermelha, ao passo que o tipo III, é marcado de verde. Na realização da técnica, as lâminas são coradas com Picrossirius durante 1 hora em estufa a 60°C (o corante já pré-aquecido a 60°C), depois lavadas em água destilada, coradas com hematoxilina por 8 minutos e lavadas em água corrente.
- Feulgen: Segundo Paulete & Beçak (1976), após a hidrólise ácida moderada, o DNA, quando tratado com o reativo de Schiff, dá lugar à formação de um produto que se cora em vermelho arroxeado. Para realizar a técnica as escamas são hidrolisadas em ácido clorídrico 1N mantido

a 60° C durante 5 a 15 minutos. A hidrólise é detida mergulhando o material em água destilada fria ou ácido clorídrico 1N frio, e depois o mesmo é corado com reativo de Schiff de 1 a 3 horas, lavado em 3 banhos sucessivos de 1 a 2 minutos cada de água sulfurosa. Por fim, o material é lavado em água corrente.

- Azul de toluidina: Segundo Junqueira & Junqueira (1983), o método cora estruturas ácidas das células (RNA, DNA e mucopolissacarídeos), formando ligações eletrostáticas com os radicais ácidos nos tecidos. Na realização da técnica as escamas são imersas no corante pH 3.5 pré-aquecido a 60° C por 1 hora em estufa, depois lavadas em água destilada e imersas em solução aquosa de molibdato de sódio ou potássio.

### **c) Protocolo para análise ultraestrutural**

Devido ao grande volume de amostras que foi coletado e devido ao número limitado de escamas que pode ser removido dos animais sem sacrificá-los, as análises ultraestruturais foram realizadas apenas nas amostras dos experimentos letais.

Para a microscopia eletrônica de varredura o material foi fixado em fixador Karnovsky por 48 horas e desidratado em acetona em concentrações crescentes de 50% a 100%, em banhos de 5 minutos. Após a desidratação em acetona, o material passou pelo ponto crítico, para finalizar o processo de desidratação, e depois foi colado em stubs com fita dupla face. O stubs foram levados ao metalizador para receber cobertura de carbono e ouro, e por fim, o material foi observado no Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi TM3000.

### **d) Análises ultraestruturais, morfométricas e estatísticas**

Diversos parâmetros na histologia e histoquímica foram quantificados nos três grupos experimentais e alguns parâmetros só puderam ser analisados qualitativamente, como descrito abaixo.

Todas as análises histológicas em escamas foram realizadas em 8 secções longitudinais e seriadas e em 8 escamas por indivíduo porque se trata de um número considerável de repetições das medidas e porque é possível incluir 4 escamas em cada bloco de historesina, cada escama apoiada em uma das paredes da forma na qual os blocos são feitos. Logo, 8 escamas são facilmente analisadas com apenas 2 blocos feitos para cada indivíduo.

As células mucosas são a primeira linha de defesa contra agentes poluentes em peixes (COELLO & KHAN, 1996) e o aumento no número dessas células é uma reação comum à contaminantes (ZACCONE et al., 2001). Assim, o número total de células mucosas foi contado

na porção espessa do epitélio da escama em lâminas submetidas a PAS em todas as repetições dos experimentos letais e não-invasivos.

Análises do conteúdo de colágeno da escama foram realizadas em lâminas submetidas a picrossirus red apenas nos experimentos letais e estas foram qualitativas apenas, pois a morfometria não foi possível devido ao grande volume de amostras a serem processadas. O mesmo se aplica para o estudo da morfologia nuclear e do conteúdo ácido realizado nas lâminas submetidas a Feulgen e Azul de Toluidina respectivamente.

Todas as técnicas descritas a seguir também foram realizadas apenas em amostras coletadas no experimento letal. Células club produzem feromônios em resposta a agentes tóxicos e estressantes (BROWN, 2003) e muito recentemente elas têm sido usadas como indicadores da presença de patógenos, ocorrência de lesões mecânicas na pele e resposta de fuga à predadores (CHIVERS et al., 2007). As contagens de células club se deram em todo o comprimento da porção espessa do epitélio em lâminas submetidas a H.E..

Além disso, diversos autores verificam aumento na espessura da pele de peixes em função da presença de xenobiontes (por exemplo, LYNG et al., 2004). A espessura foi medida em 5 pontos equidistantes da porção espessa do epitélio da escama em lâminas submetidas a H.E. com auxílio do software ImageJ, em uma metodologia proposta por nós. Os cinco pontos equidistantes começam da extremidade proximal do epitélio e passam pelos pontos que representam 0.25, 0.5 e 0.75 do comprimento total do epitélio, chegando à extremidade distal. Também foram tomadas medidas do comprimento total da escama e do comprimento da porção espessa do epitélio por motivos explicitados mais à frente no texto (Figura 4.4).

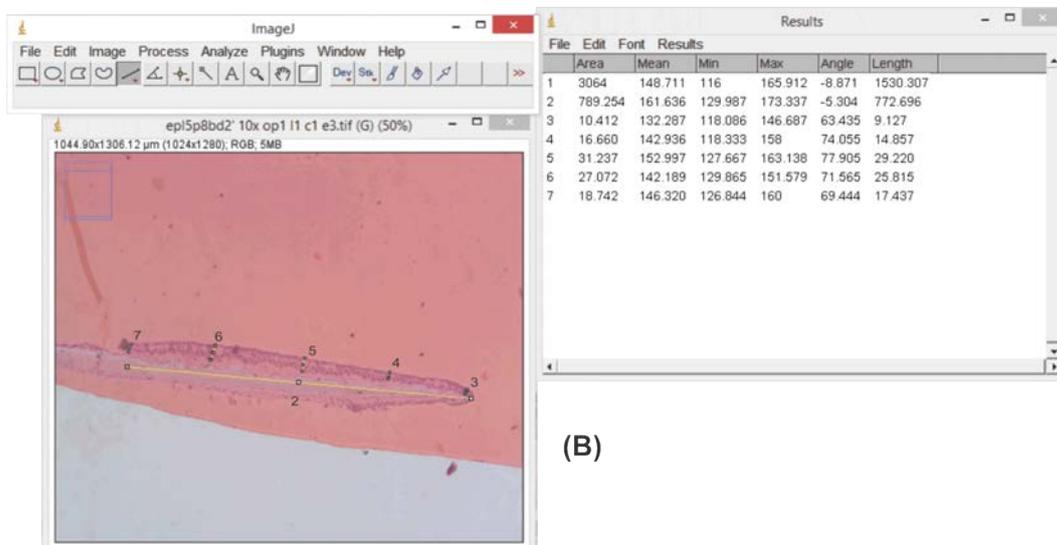
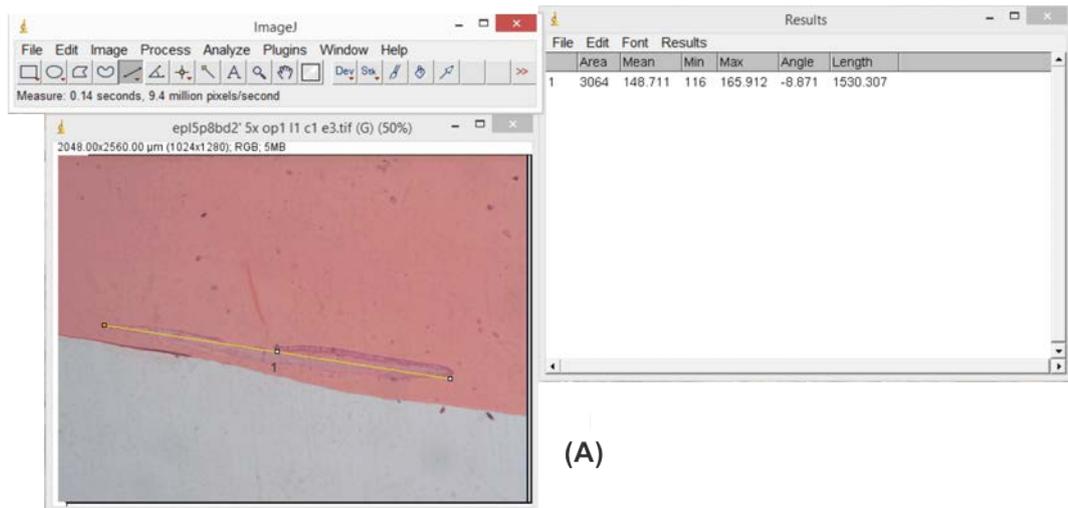
As análises ultramorfológicas da varredura permitiram verificar qualitativamente possíveis alterações nos padrões de organização das microcristas como verificado por outros autores (MISRA et al., 1987). Foram analisadas cerca de 10 escamas por indivíduo e 4 indivíduos por grupo em cada coleta. O padrão de microcristas foi observado na porção recoberta pela camada mais espessa de epitélio (Figura 3.2- A), como descrito por Alves et al. (2013).

O grau de alteração em órgãos como as brânquias pode ser relacionado a diferentes poluentes, suas concentrações e rotas de incorporação (ARELLANO et al., 2001) e por este motivo as alterações histopatológicas foram contadas em 10 filamentos primários por corte e 8 cortes de 1 arco branquial por indivíduo em lâminas submetidas a H.E.

As contagens de número de alterações morfológicas da brânquia, número de células de muco, número de células club e espessura do epitélio foram submetidas a análise estatística, passando primeiramente pelo teste Shapiro-Wilk de normalidade, e posteriormente pelo teste

não-paramétrico de comparação de médias Kruskal-Wallis/Dunn no software GraphPad Prism 6©.

**Figura 4.4-** Janelas de trabalho do software ImageJ mostrando (A) medida de comprimento total da escama (1) e (B) medida de comprimento da porção espessa do epitélio (2) e de espessura em cinco pontos equidistantes no epitélio, começando no ponto proximal (3) e passando pelos pontos que representam 0.25 do comprimento total do epitélio (4), 0.5 (5) e 0.75 (6), chegando à extremidade distal (7). Os números dos pontos correspondem aos valores apresentados na janela intitulada 'Results'. Fonte: Elaborada pelo autor.



Apesar dos esforços em coletar escamas da mesma região para se obter tamanhos padronizados, obtivemos dados de escamas de tamanhos diferentes. Para verificar se as medidas de espessura do epitélio dependeram não só da exposição ao LAS, mas do tamanho (aqui entendido como comprimento) das escamas amostradas ou do comprimento da porção espessa

do epitélio, essas medidas foram analisadas por meio de regressões lineares no software GraphPad Prism 6©.

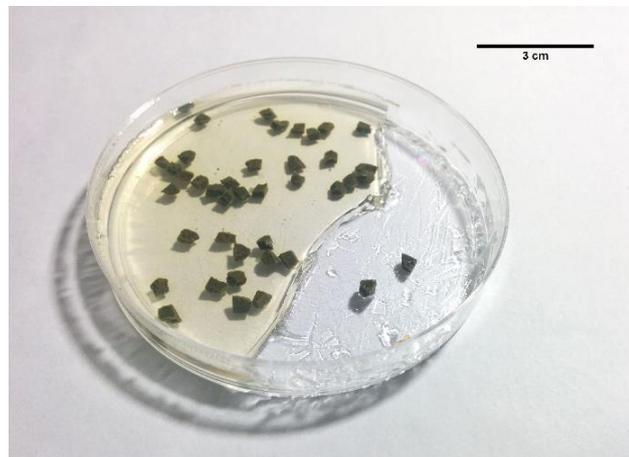
Os dados de coletas em tempos diferentes foram analisados separadamente, pois os animais amostrados em tempos diferentes tinham idades diferentes. Como os espécimes amostrados eram juvenis, ainda se encontravam em fase de crescimento e suas escamas acompanham esse crescimento, o que poderia tendenciar os resultados.

#### e) Comportamento alimentar

O protocolo utilizado foi adaptado para esta espécie em parceria com o colaborador deste projeto, o Prof. Dr. Rui Ribeiro, do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra - Portugal. Como descrito nos itens “4.1” e “4.2 – a” os indivíduos utilizados para esta análise foram mantidos em aquários de vidro individualizados e a taxa de alimentação foi quantificada nos mesmos peixes dos quais foram retiradas as escamas.

O alimento fornecido aos peixes consistiu em fragmentos de ração à base de algas embebidos em gelatina. Para produzir os fragmentos a ração foi cortada em pedaços e pesada em balança analítica até atingir o peso aproximado de 0.01g. Os fragmentos foram embebidos em gelatina em placas de Petri e levados à geladeira. Após a gelatina com fragmentos de ração gelificar, os fragmentos foram removidos da placa e pesados afim de garantir que tivessem aproximadamente o mesmo peso, em torno de 0.04g (Figura 4.5). Quinze fragmentos dessa ração embebida em gelatina foram fornecidos para cada animal ao início do período de alimentação e o número de fragmentos restantes foi contado após o período de alimentação.

**Figura 4.5-** Placa de Petri com fragmentos de ração embebidos (à esquerda) e cortados e prontos para o experimento (à direita). Fonte: Elaborada pelo autor.



Antes da coleta de escamas cada animal recebeu os 15 fragmentos de ração e foi permitido que cada espécime se alimentasse por 2 horas. Após este período, o alimento excedente foi recuperado dos aquários e contado e o peixe foi amostrado para as escamas como descrito no item “4.2 – a”.

Estes dados dos aquários individuais foram coletados durante todo o período de experimento em 4 indivíduos por grupo em cada uma das repetições (há apenas quatro aquários por grupo disponíveis nas instalações do laboratório), seguindo o mesmo cronograma do experimento descrito anteriormente. Assim, os experimentos nos aquários individuais foram repetidos 4 vezes, até se obter um tamanho amostral igual àquele dos experimentos letais.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk de normalidade, e posteriormente pelo teste não-paramétrico de comparação de médias Kruskal-Wallis/Dunn no software GraphPad Prism 6©.

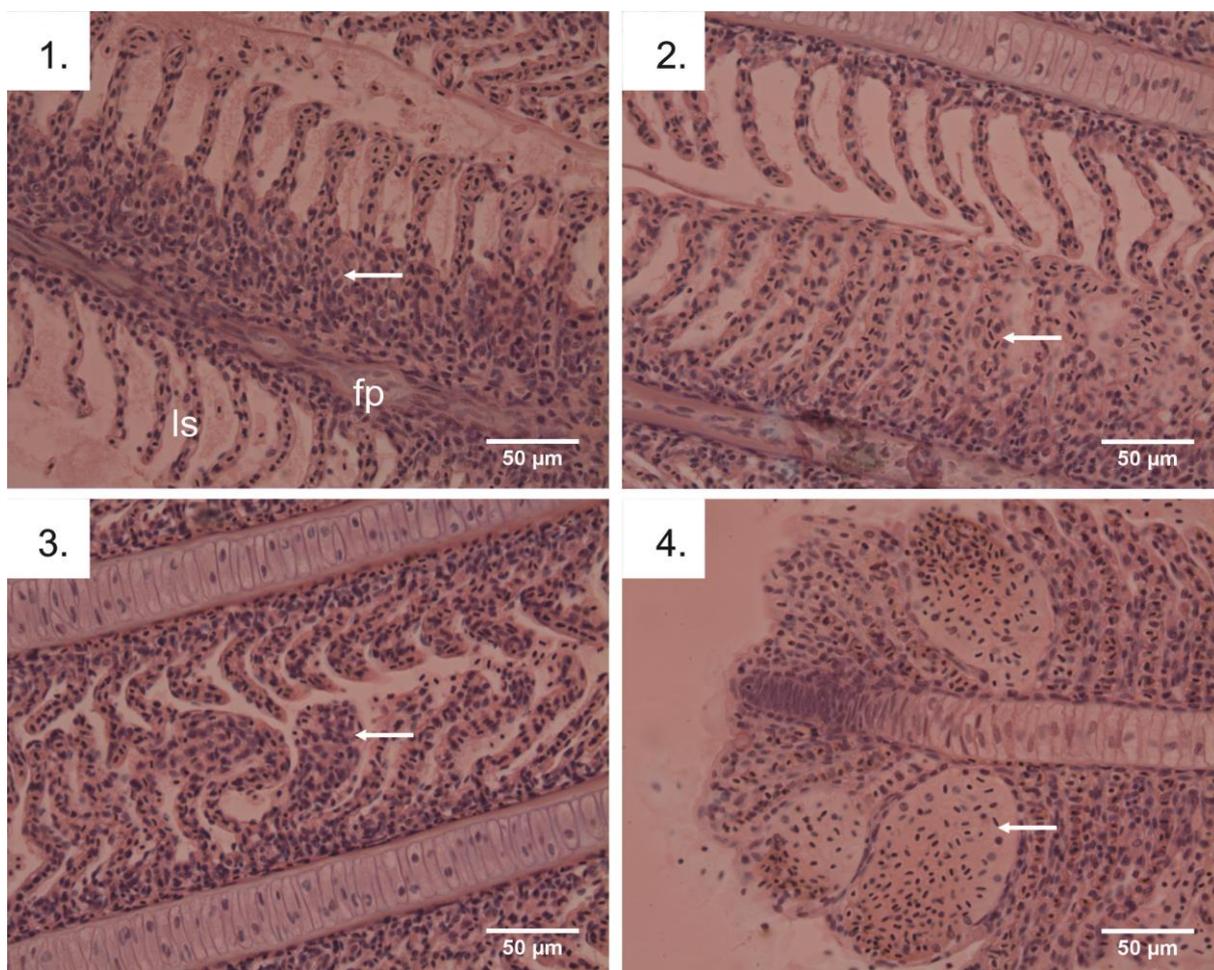
## 5. Resultados

Os relatórios que listam os resultados da análise química da água utilizada e as análises para detectar a concentração real de surfactante constam nos anexos I e II ao final deste documento. As análises químicas não mostraram grandes diferenças nas concentrações/valores de quase todos os parâmetros testados; alguns íons/elementos estavam elevados nas amostras de diluição de LAS:  $\text{SO}_4^{2-}$  nas diluições de 0.36 mg/L e alumínio em ambas as concentrações de LAS. Apenas o  $\text{Cl}^-$  estava elevado nas amostras do controle.

### 5.1. Morfologia das brânquias

Cinco tipos de alterações morfológicas foram encontradas nas brânquias, sendo elas hipertrofia das células pilares, hiperplasia nas lamelas secundárias, hiperplasia no filamento primário, fusão lamelar e aneurisma. Identificadas como ilustra a figura 5.3.

**Figura 5.3-** Brânquias submetidas à técnica de H.E. do grupo controle (1) exemplificando hiperplasia do filamento primário (seta) e também no grupo controle (2), exemplificando hiperplasia das lamelas secundárias (seta). Brânquia do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS (3) exemplificando fusão lamelar (seta) e no grupo exposto a 3.6 mg/L (4), exemplificando aneurisma (seta). Estão indicados filamento primário (fp) e lamelas secundárias (ls).



Alterações como hiperplasia e hipertrofia aumentaram em número no início dos experimentos em ambos os grupos expostos ao surfactante. Nas duas últimas coletas a elevação desses índices foi esporádica, ocorrendo apenas aos 21 dias para hiperplasia da lamela secundária e aos 30 dias para hiperplasia do filamento primário (Tabela 5.2). Este aumento não diferiu significativamente entre as duas concentrações durante todo o experimento, apenas no 21º dia para hiperplasia lamelar ( $p < 0.05$ ).

O número de ocorrências de fusão lamelar também foi maior apenas no início dos experimentos, sendo que este aumento foi significativamente maior no grupo exposto a 3.6 mg/L de surfactante aos 14 dias de experimento ( $p < 0.05$ ). Após 21 dias o número de fusões reduziu apenas no grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS (Tabela 5.2), motivo pelo qual a resposta nos dois grupos expostos a LAS diferiu significativamente ( $p < 0.05$ ).

No início do experimento os aneurismas ocorreram em maior número apenas no grupo exposto a 0.36 mg/L e conseqüentemente o número de ocorrências apresentou diferenças significativas entre os dois grupos expostos ao surfactante ( $p < 0.05$ ). Entretanto, durante o restante do experimento o número de aneurismas aumentou significativamente em ambos os grupos expostos a LAS (Tabela 5.2), sem diferir entre si na resposta.

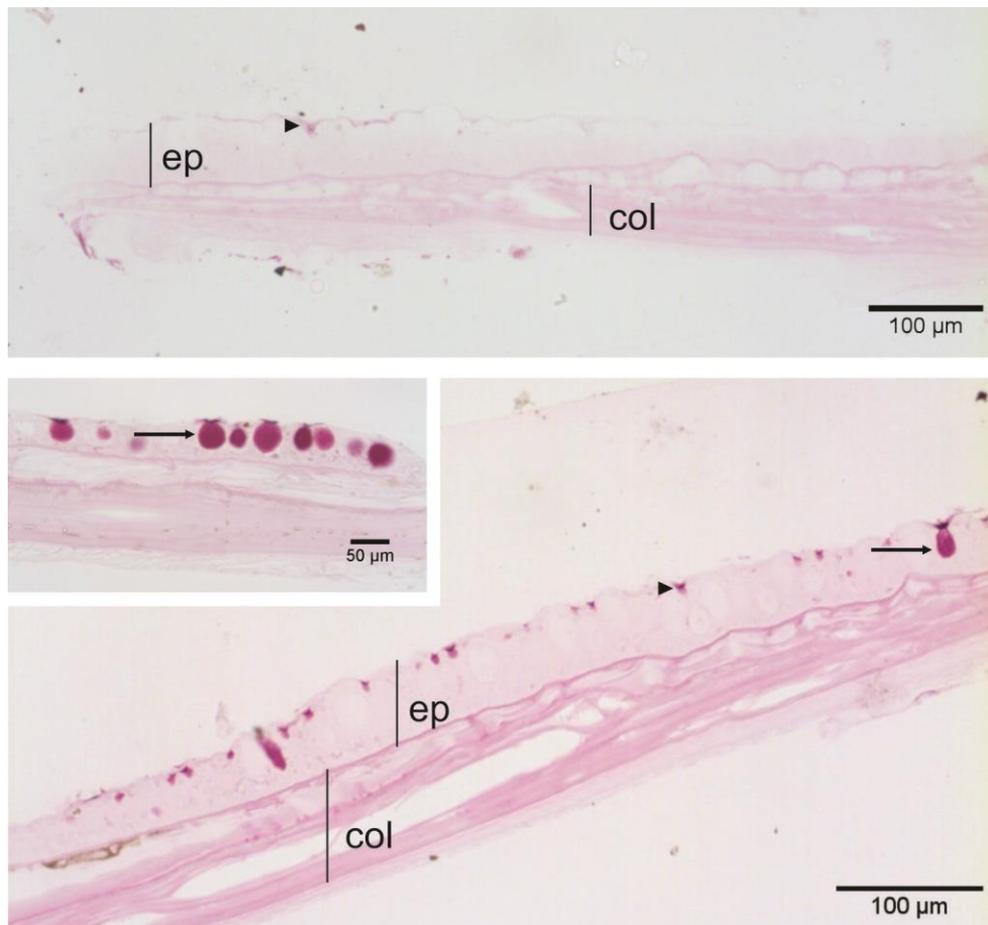
**Tabela 5.2-** Médias, desvios padrão ( $S \pm$ ) e intervalos de confiança ( $p$ ) para Kruskal-Wallis/Dunn nos cinco tipos de alteração morfológica branquial.

		Controle		0.36 mg/L			3.6 mg/L		
		Média	$S \pm$	Média	$S \pm$	$p$	Média	$S \pm$	$p$
Hipertrofia	<b>14 dias</b>	0.08	0.61	0.42	1.83	<0.05	0.36	1.83	ns
	<b>21 dias</b>	0.05	0.62	0.04	0.50	ns	0.06	0.47	ns
	<b>30 dias</b>	0.01	0.13	0.01	0.12	ns	0.00	0.00	ns
Hiperplasia lamelar	<b>14 dias</b>	0.64	1.77	1.42	2.82	<0.05	1.47	2.61	<0.05
	<b>21 dias</b>	1.22	2.17	0.93	1.78	ns	3.78	4.45	<0.05
	<b>30 dias</b>	0.89	1.91	0.86	1.86	ns	0.48	0.98	ns
Hiperplasia do filamento	<b>14 dias</b>	0.03	0.32	0.14	0.63	<0.05	0.27	1.15	<0.05
	<b>21 dias</b>	0.03	0.21	0.07	0.36	ns	0.05	0.31	ns
	<b>30 dias</b>	0.05	0.23	0.10	1.08	ns	0.00	0.00	<0.05
Fusão	<b>14 dias</b>	3.01	3.73	2.46	3.71	<0.05	4.14	5.09	<0.05
	<b>21 dias</b>	1.58	2.60	1.23	2.59	<0.05	1.83	3.49	ns
	<b>30 dias</b>	0.65	1.34	0.86	1.64	ns	0.60	1.11	ns
Aneurisma	<b>14 dias</b>	0.24	1.08	0.88	1.52	<0.05	0.08	0.47	ns
	<b>21 dias</b>	0.03	0.28	0.26	0.86	<0.05	0.36	1.00	<0.05
	<b>30 dias</b>	0.29	1.32	0.80	1.77	<0.05	0.56	1.05	<0.05

## 5.2. Contagem de células de muco

As células produtoras de muco foram identificadas como marcações magenta no epitélio da escama e em alguns casos a reação evidenciou bolsões formados pela união da secreção oriunda de mais de uma célula mucosa (Figura 5.1).

**Figura 5.1-** Escama do grupo controle (acima) e do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS (abaixo) submetida à técnica de PAS. A cabeça de seta indica a marcação de célula mucosa, as legendas indicam o colágeno que compõe a escama (col) e o epitélio que a recobre (ep). Na segunda foto e no detalhe, bolsões formados pela união da secreção de várias células (seta).



Os experimentos letais mostraram aumento significativo do número de células mucosas no grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS a partir dos 21 dias. Entretanto, os experimentos de alimentação mostraram redução significativa durante todo o experimento. Aumento no número de células de muco no grupo exposto a 0.36 mg/L foi esporádico (Tabela 5.1).

As comparações entre os grupos expostos a 0.36 e 3.6 mg/L diferiram significativamente em todas as coletas de ambos os experimentos. As exceções foram a coleta de 21 dias dos experimentos letais e a de 14 dias dos experimentos de alimentação que

apresentaram aumento/redução significativa respectivamente também nos grupos expostos a 0.36 mg/L de LAS.

No geral, as diferenças significativas entre grupos expostos ao surfactante foram observadas nos casos em que a resposta em um dos grupos não foi significativa, embora o tenha sido no outro grupo.

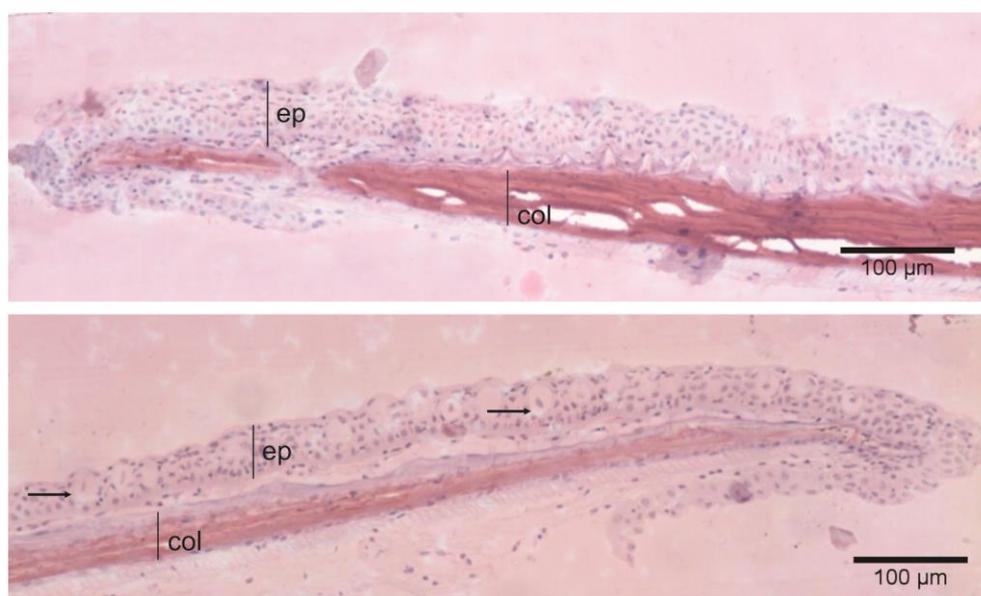
**Tabela 5.1-** Médias, desvios padrão (S±) e intervalos de confiança (p) para Kruskal-Wallis/Dunn nos dois tipos de experimento para as contagens de células de muco.

		Controle		0.36 mg/L		3.6 mg/L			
		Média	S±	Média	S±	p	Média	S±	p
Exp. letal	14 dias	3.30	3.47	3.49	3.64	ns	3.46	5.17	ns
	21 dias	2.73	2.62	4.62	3.81	< 0.05	8.45	7.26	< 0.05
	30 dias	4.52	4.57	5.77	6.43	ns	8.23	6.30	< 0.05
Exp. de alimentação	14 dias	6.70	7.96	8.95	9.25	< 0.05	2.57	2.95	< 0.05
	21 dias	11.10	13.48	10.06	9.41	ns	6.41	6.09	< 0.05
	30 dias	12.32	11.88	10.79	9.09	ns	8.64	7.64	< 0.05

### 5.3. Contagem de células club

As células club foram identificadas como células bem maiores que as demais, de citoplasma homogêneo e pouco reativo ao corante e núcleo excêntrico (Figura 5.2).

**Figura 5.2-** Escama do grupo controle (acima) e do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS (abaixo) submetida à técnica de H.E.. A seta indica a marcação célula club, as legendas indicam o colágeno que compõe a escama (col) e o epitélio que a recobre (ep).



Houve aumento significativo no número de células club apenas aos 14 dias de experimento e apenas no grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS. O grupo exposto à maior concentração do surfactante exibiu redução significativa do número de células club neste período (Tabela 5.2).

Aos 21 dias de experimento o número dessas células não variou significativamente entre os grupos expostos ao detergente e o controle. Ao final do experimento, o número de células club diminuiu em ambos os grupos expostos a LAS em relação ao controle (Tabela 5.2). As comparações entre os dois grupos expostos ao surfactante diferiram significativamente apenas aos 14 dias de experimento, pois houve aumento no número de células em grupo experimental, e diminuição no outro.

**Tabela 5.2-** Médias, desvios padrão (S±) e intervalos de confiança (p) para Kruskal-Wallis/Dunn no experimento letal para contagens de células club.

		Controle		0.36 mg/L		p	3.6 mg/L		p
		Média	S±	Média	S±		Média	S±	
Exp. letal	<b>14 dias</b>	1.21	2.00	3.22	4.76	< 0.05	0.21	0.58	< 0.05
	<b>21 dias</b>	2.85	3.3	3.65	5.49	ns	2.80	3.61	ns
	<b>30 dias</b>	1.71	2.06	0.33	0.90	< 0.05	0.10	0.53	< 0.05

#### 5.4. Análise de espessura

Como a espessura do epitélio não é estável nos cinco pontos medidos, cada região foi comparada separadamente, de maneira que obtivemos um painel da variação da espessura por região do epitélio (Tabela 5.3).

A espessura do epitélio aumentou significativamente ao início do experimento no grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS em todas as suas regiões e reduziu-se significativamente no grupo exposto à maior concentração, exceto no terceiro ponto medido (ponto 0.75). Aos 21 dias de experimento a espessura do epitélio aumentou significativamente em ambos os grupos expostos a LAS e em todas as regiões, exceto na extremidade proximal no grupo exposto a 0.36 mg/L de surfactante (Tabela 5.3).

Após 30 dias de experimento a espessura do epitélio diminuiu, também nos dois grupos expostos ao surfactante e em todas as regiões do epitélio (Tabela 5.3).

Em geral, as comparações entre os grupos expostos às duas concentrações não diferiram significativamente quando os dois grupos exibiram aumento na espessura do epitélio comparados ao controle (respostas estatisticamente equivalentes), exceto aos 14 dias de experimento para a extremidade distal da escama.

O mesmo aconteceu quando ambos os grupos expostos ao LAS apresentaram redução significativa da espessura do epitélio, exceto aos 30 dias para a extremidade distal, que apresentou respostas estatisticamente diferentes entre os dois grupos. Isso se deve provavelmente ao fato de que algumas vezes a porção espessa do epitélio reduz-se à apenas uma camada abruptamente (Figura 3.2), outras vezes a redução é gradual, o que reflete como medidas bastante variáveis para esse ponto do epitélio entre os indivíduos amostrados e eventualmente entre grupos experimentais.

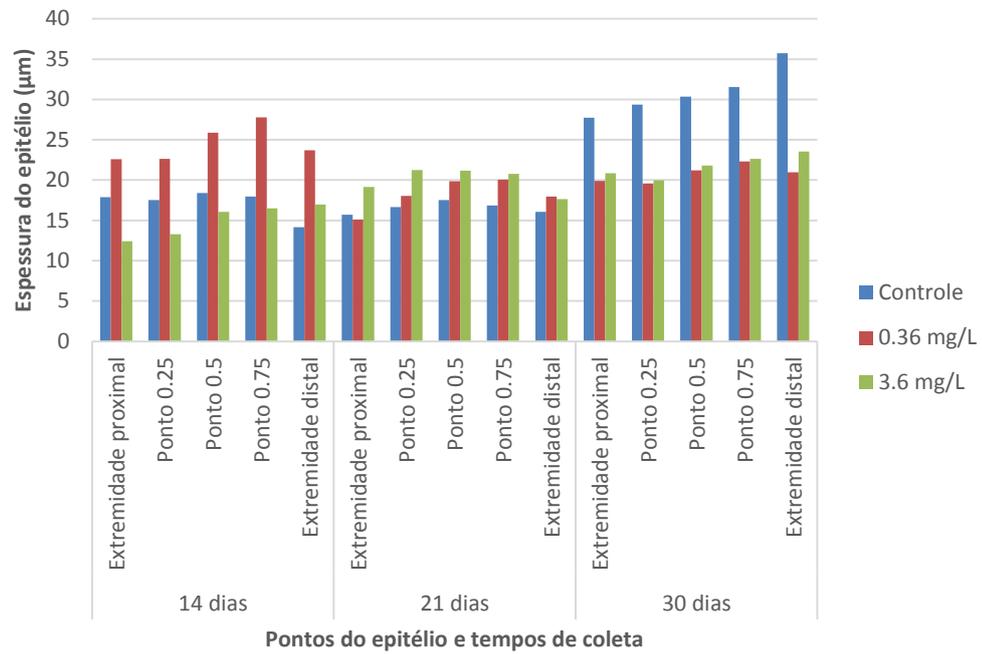
**Tabela 5.3-** Médias da espessura em micrômetros, desvios padrão (S±) e intervalos de confiança (p) para Kruskal-Wallis/Dunn no experimento letal em cinco pontos medidos no epitélio da escama.

		Controle		0.36 mg/L		p	3.6 mg/L		p
		Média	S±	Média	S±		Média	S±	
Extremidade proximal	<b>14 dias</b>	17.89	10.30	22.58	11.69	<0.05	12.41	8.18	<0.05
	<b>21 dias</b>	15.70	7.25	15.09	7.98	ns	19.14	10.74	<0.05
	<b>30 dias</b>	27.75	10.45	19.90	9.82	<0.05	20.86	12.40	<0.05
Ponto 0.25	<b>14 dias</b>	17.53	8.08	22.64	7.50	<0.05	13.28	7.35	<0.05
	<b>21 dias</b>	16.67	5.32	18.03	6.52	<0.05	21.24	9.22	<0.05
	<b>30 dias</b>	29.36	8.90	19.58	8.36	<0.05	19.98	10.33	<0.05
Ponto 0.5	<b>14 dias</b>	18.41	7.84	25.89	8.71	<0.05	16.04	8.26	<0.05
	<b>21 dias</b>	17.52	5.22	19.86	6.63	<0.05	21.15	7.40	<0.05
	<b>30 dias</b>	30.35	8.24	21.22	7.63	<0.05	21.81	8.64	<0.05
Ponto 0.75	<b>14 dias</b>	17.97	10.63	27.77	9.10	<0.05	16.48	7.31	ns
	<b>21 dias</b>	16.86	5.50	20.04	7.94	<0.05	20.76	7.70	<0.05
	<b>30 dias</b>	31.53	10.17	22.30	8.46	<0.05	22.62	9.64	<0.05
Extremidade distal	<b>14 dias</b>	14.16	8.87	23.70	11.30	<0.05	16.97	8.72	<0.05
	<b>21 dias</b>	16.05	6.74	17.97	8.46	<0.05	17.65	7.03	<0.05
	<b>30 dias</b>	35.75	69.84	20.95	8.98	<0.05	23.54	10.21	<0.05

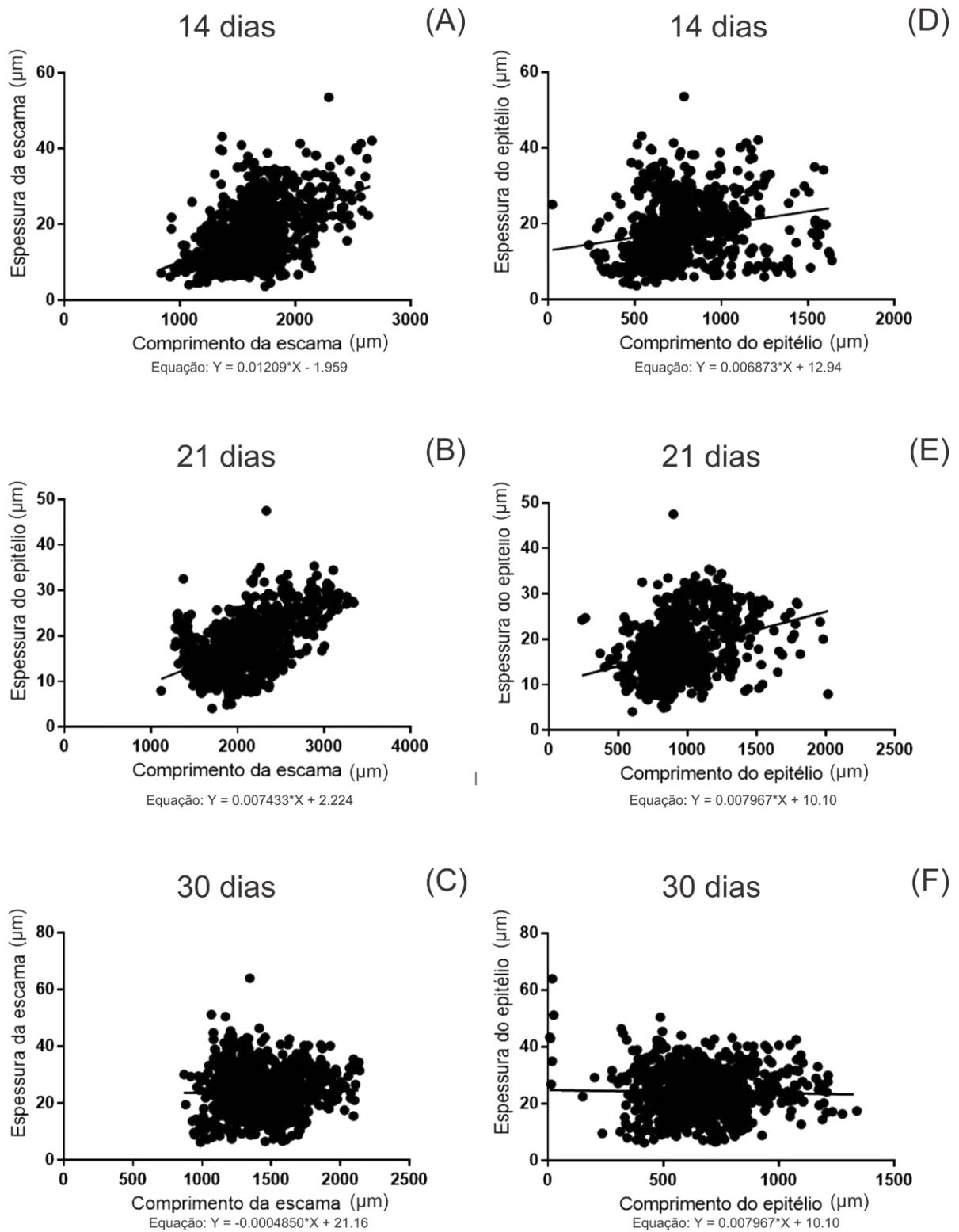
As comparações entre grupos expostos diferiram significativamente apenas em ocasiões nas quais um dos grupos apresentou aumento na espessura do epitélio, enquanto o outro exibiu redução. O gráfico 5.1 auxilia na visualização dos dados.

Por fim, as regressões não apontaram uma relação linear entre o comprimento da escama e a espessura do epitélio ou entre o comprimento da porção espessa do epitélio e a espessura do mesmo. Em todos os casos, os dados se aglomeraram e não formaram uma reta concisa (Figura 5.3).

**Gráfico 5.1-** Espessura do epitélio em micrômetros ao longo do tempo nos três grupos experimentais.



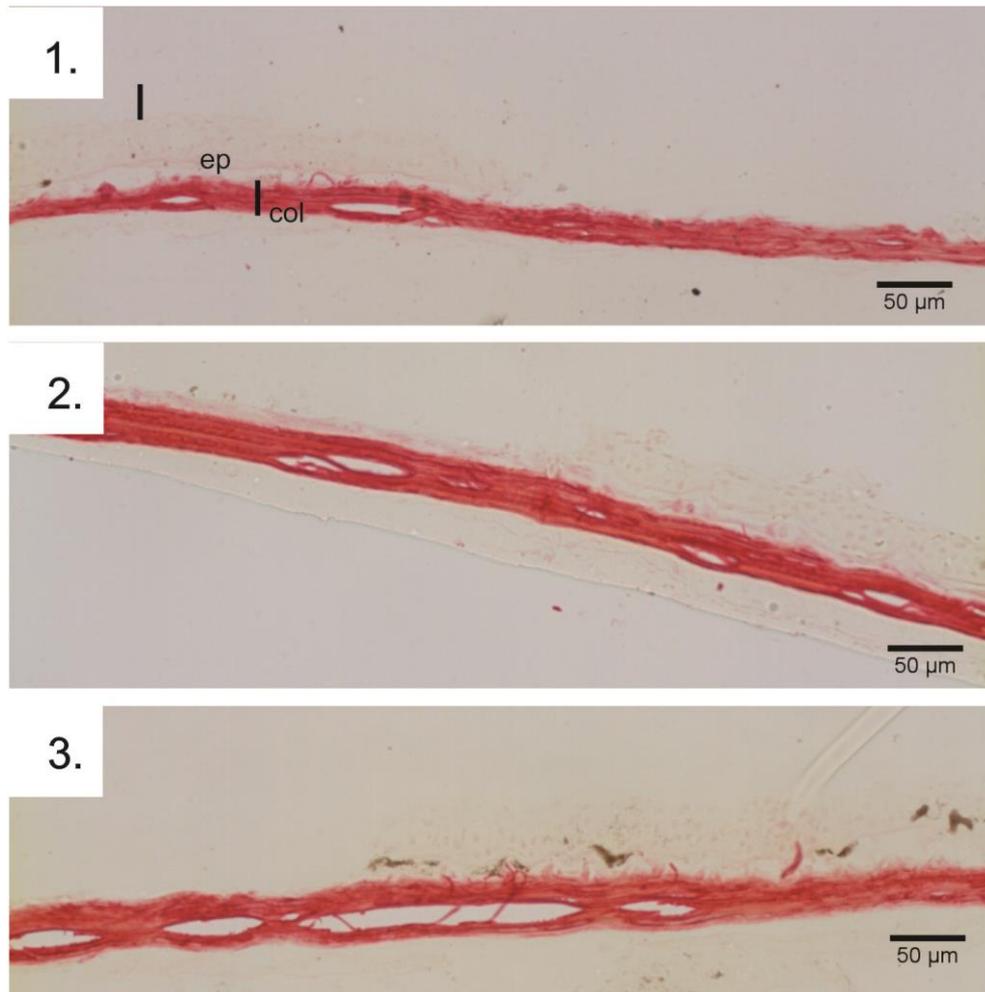
**Figura 5.3-** Regressões lineares da espessura do epitélio em micrômetros em relação ao comprimento da escama em micrômetros (gráficos A ao C) e da espessura do epitélio em relação ao comprimento do mesmo (gráficos D ao F), nas três coletas realizadas (14, 21 e 30 dias) nos experimentos letais.



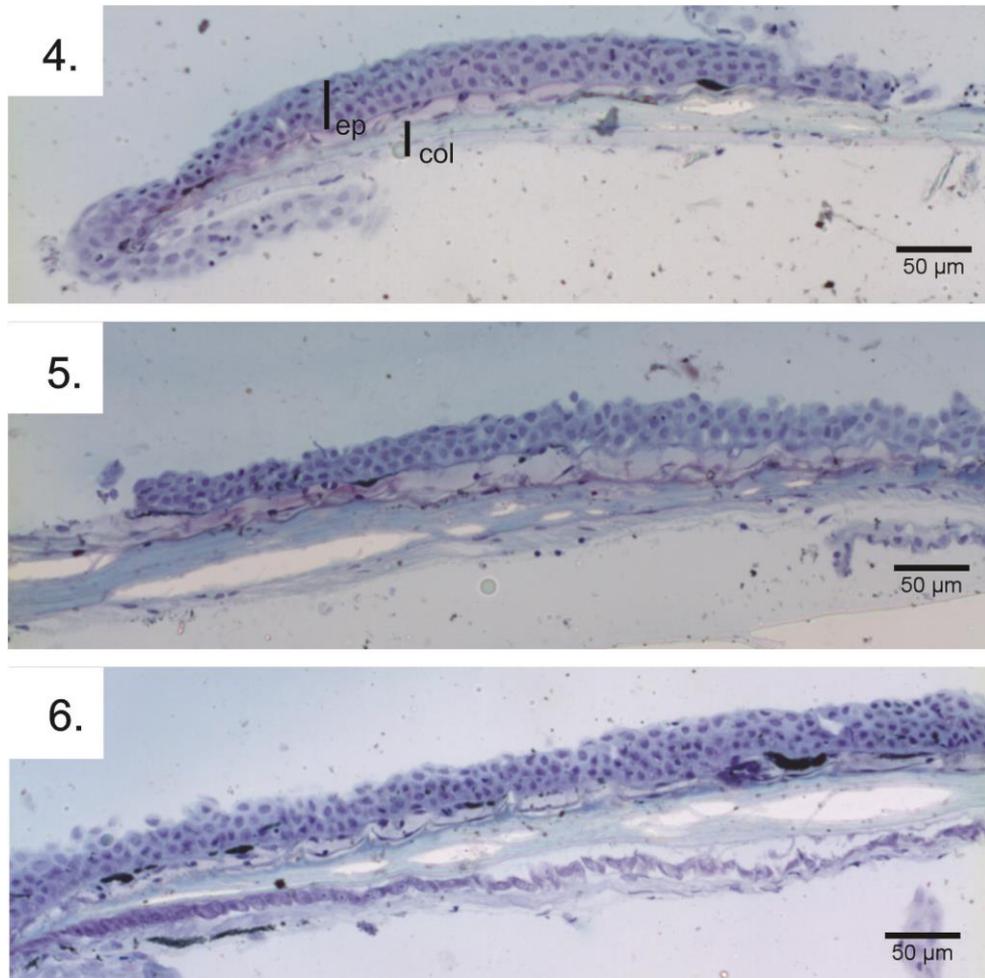
### 5.5. Técnicas qualitativas

As técnicas de picosirius red e azul de toluidina não mostraram alterações qualitativamente perceptíveis (Figuras 5.4 e 5.5).

**Figura 5.4-** Escamas dos grupos controle (1), concentração 0.36 mg/L (2) e 3.6 mg/L (3) submetidas à técnica de picosirius red. ep- epitélio; col- colágeno.

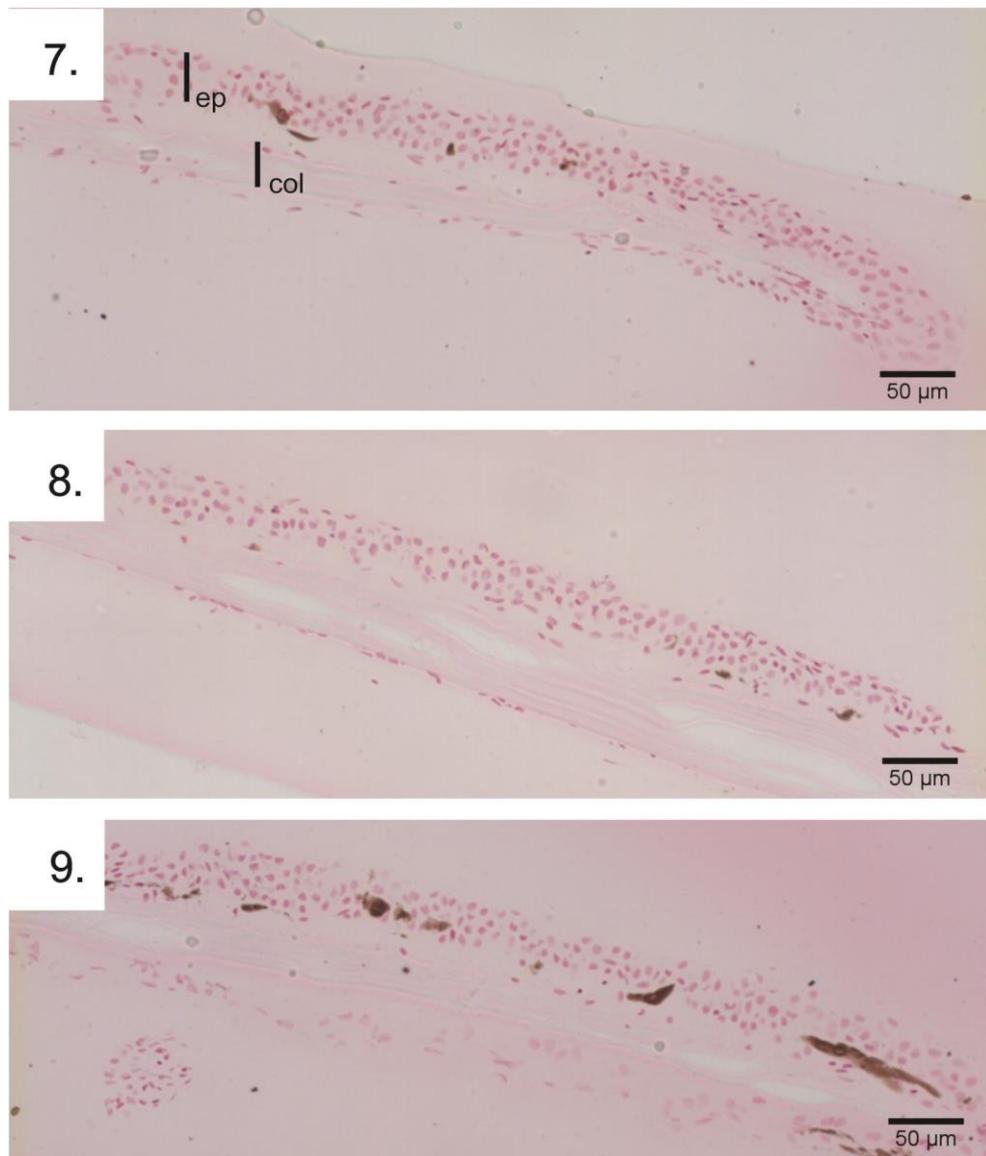


**Figura 5.5-** Escamas dos grupos controle (1), concentração 0.36 mg/L (2) e 3.6 mg/L (3) submetidas à técnica de azul de toluidina. ep- epitélio; col- colágeno.



A técnica de Feulgen também não evidenciou diferenças qualitativamente perceptíveis (Figura 5.6). Em algumas ocasiões o formato do núcleo mudou de oval para achatado nas escamas em que o epitélio era delgado, o que é apenas um reflexo da mudança na forma das células, de colunares para pavimentosas conforme a maturação do tecido. Como o epitélio é delgado, a camada intermediária que possuiria as células colunares não é evidente e observa-se claramente apenas as camadas superficiais, pavimentosas.

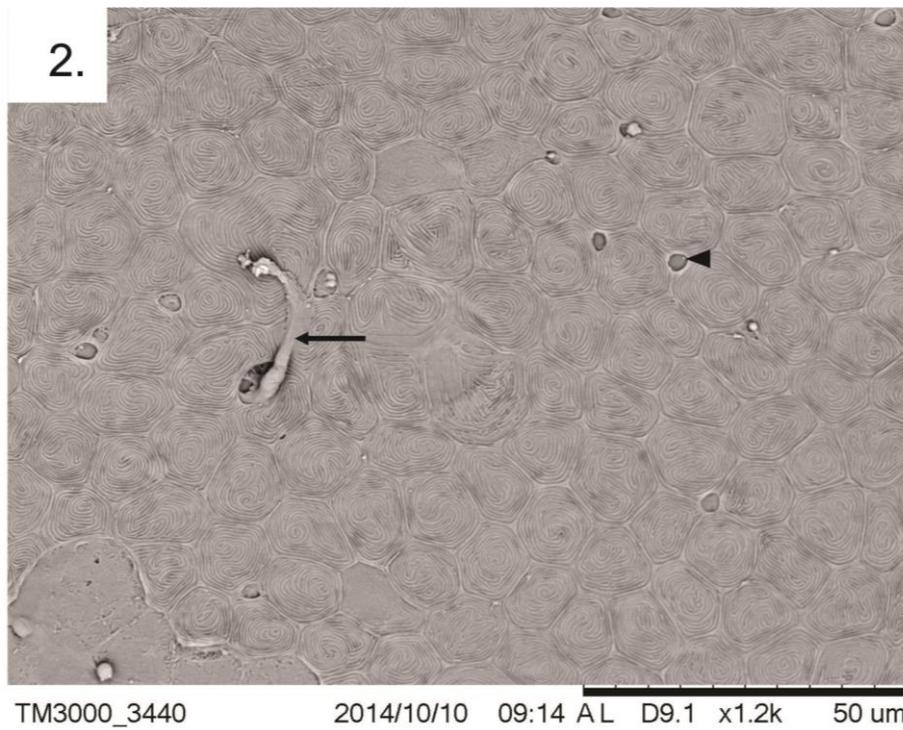
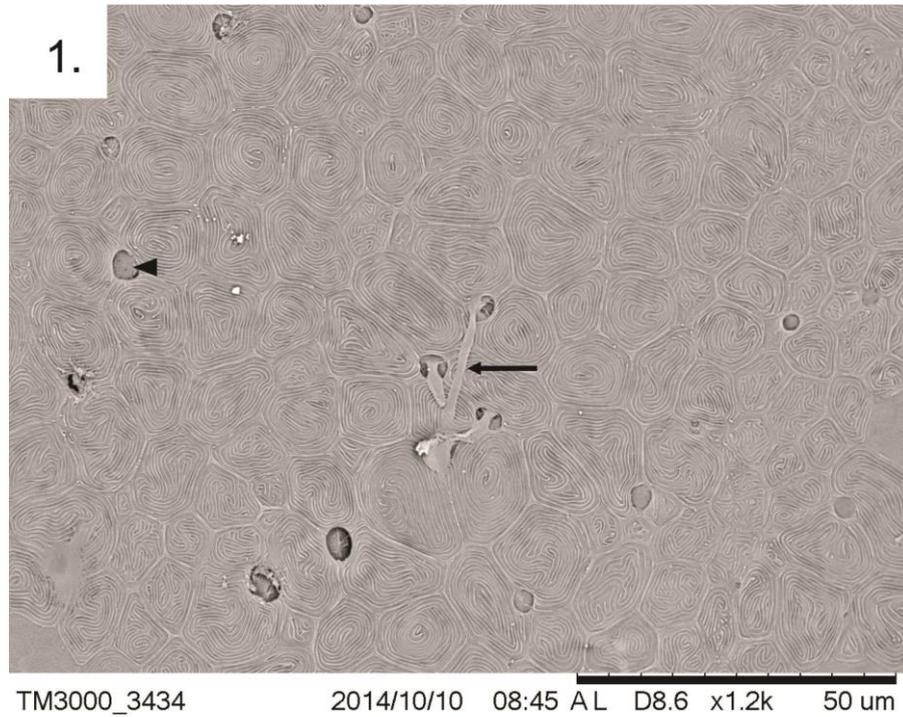
**Figura 5.6-** Escamas dos grupos controle (1), concentração 0.36 mg/L (2) e 3.6 mg/L (3) submetidas à técnica de Feulgen. ep- epitélio; col- colágeno.

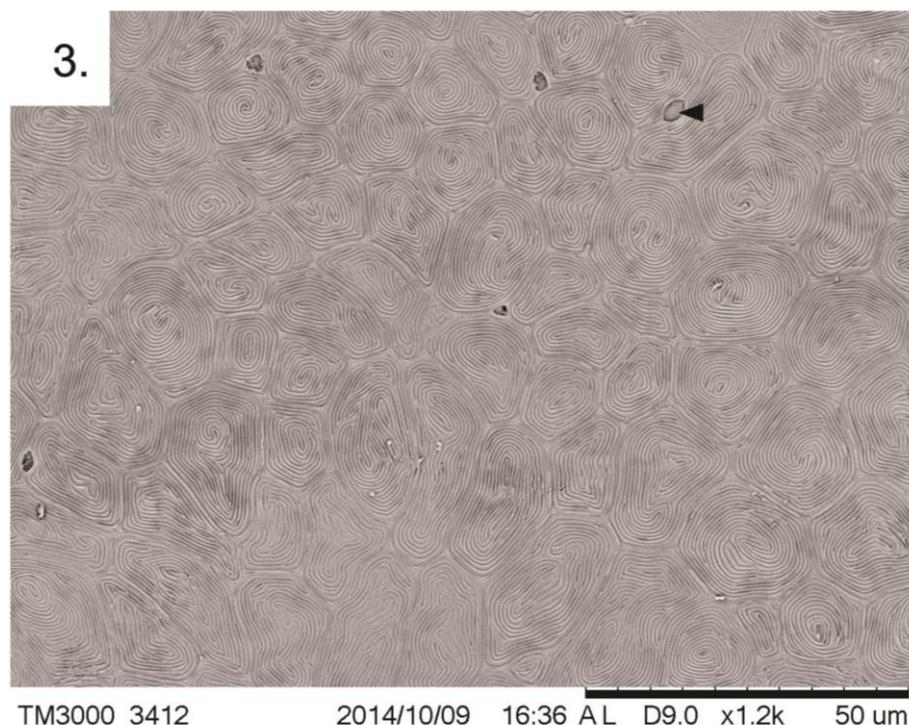


### 5.6. Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultramorfológica também não mostrou alterações qualitativamente perceptíveis na organização das microcristas (Figura 5.7).

**Figura 5.7-** Micrografias do grupo controle (1), concentração 0.36 mg/L (2) e concentração 3.6 mg/L (3). As cabeças de seta apontam os orifícios dos quais sai o muco (seta) na superfície do epitélio.





### 5.5. Experimentos de alimentação

Os experimentos de alimentação foram realizados em parceria com o co-orientador do projeto, o Prof. Rui Ribeiro, do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra - Portugal, com o intuito de integrar os dados morfométricos aos dados de alimentação. Dois animais morreram antes da última coleta do experimento devido a problemas estruturais, não devido à exposição ao surfactante.

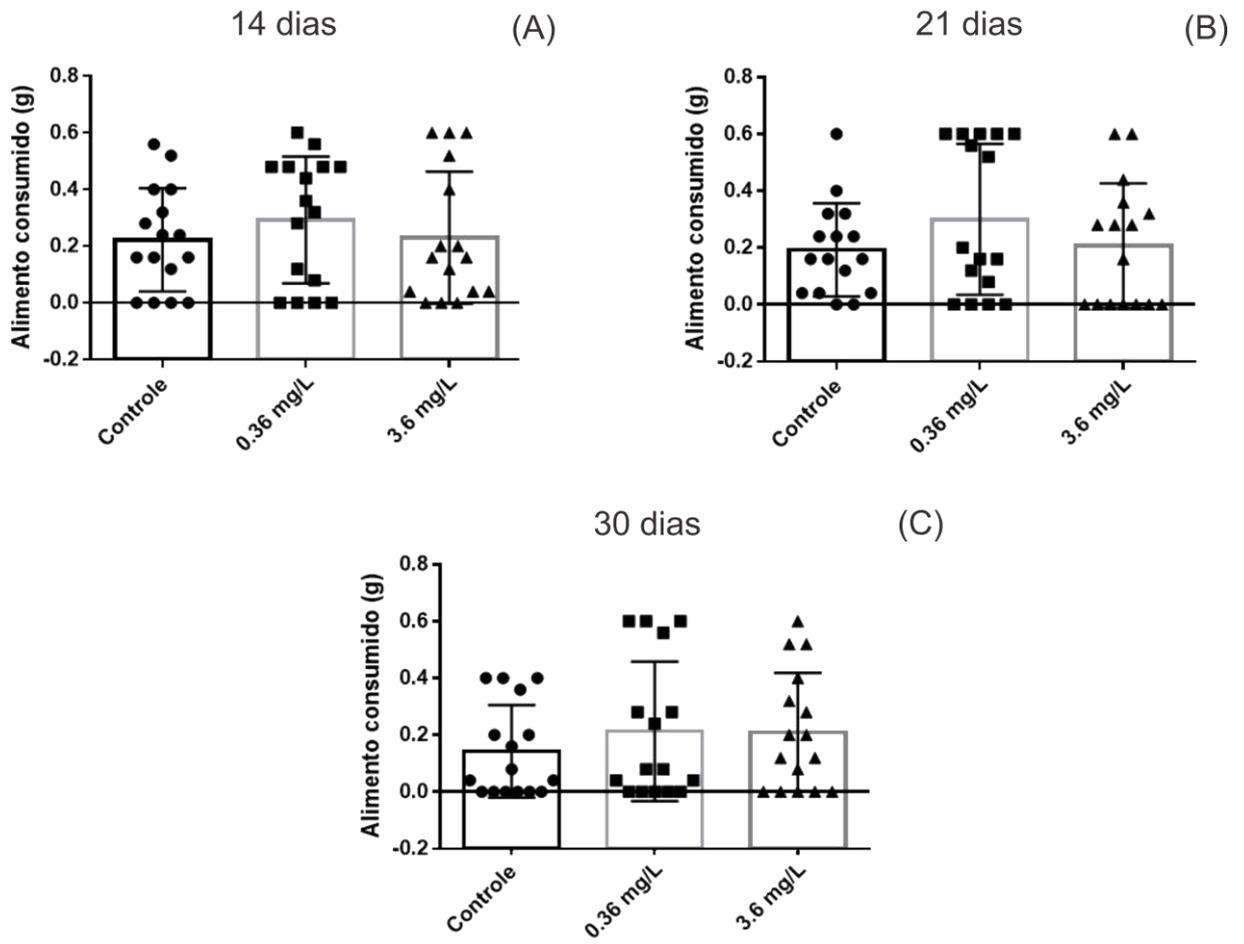
A espécie utilizada anda em cardume, de maneira que isolá-los nos aquários os estressou e alterou seu comportamento. Os animais ficaram muito agitados e alguns deles saltaram dos aquários durante os experimentos, mesmo estes sendo tampados com cartolina branca.

O teste de comparação de médias não acusou diferença significativa no consumo alimentar em nenhum dos grupos expostos a LAS em relação ao controle e nem entre as duas concentrações de surfactante em nenhuma das coletas do experimento, o que reflete os coeficientes de variação e desvios padrão dos dados bastante altos (Tabela 5.4 e figura 5.8).

**Tabela 5.4-** Porcentagem de ração consumida por indivíduo (ind.) em relação às 0.6 gramas de alimento oferecidas para cada espécime.

	1° coleta - 14 dias			2° coleta - 21 dias			3° coleta - 30 dias		
	Controle	0.36 mg/L	3.6 mg/L	Controle	0.36 mg/L	3.6 mg/L	Controle	0.36 mg/L	3.6 mg/L
<b>Média</b>	0.22	0.29	0.23	0.19	0.30	0.21	0.15	0.23	0.21
<b>S±</b>	0.18	0.22	0.23	0.16	0.26	0.22	0.16	0.25	0.21
<b>Coef. Δ</b>	81.90%	76.50%	101.30%	84.91%	88.44%	105.40%	108.14%	108.92%	99.22%

**Figura 5.8-** Gráficos da média e desvio padrão do consumo de alimento em gramas nos indivíduos dos três grupos experimentais (controle, 0.36 mg/L e 3.6 mg/L), nos três tempos de coleta (14, 21 e 30 dias).



## 6. Discussão

### 6.1. Análise das brânquias

Os contaminantes podem afetar a estrutura branquial como resultado de alterações no balanço hidromineral direta ou indiretamente, sendo que a maioria das lesões provenientes de estresse é resultado de mecanismos de defesa ou mecanismos compensatórios devido a desequilíbrios funcionais gerados pelo agente tóxico (WENDELAAR-BONGA, 1997).

A relevância das lesões depende de sua importância patológica, ou seja, da forma como a lesão afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência do animal (BERNET et al., 1999). Processos de hipertrofia e hiperplasia são classificados como mínima a moderadamente importantes e são lesões reversíveis (BERNET et al., 1999). Por este motivo, esses tipos de respostas aumentaram em número apenas ao primeiro contato com o surfactante, regrediram à medida que os animais se habituaram às mudanças ambientais e não foram mais observadas ao longo do experimento.

Essas modificações proliferativas e hipertróficas também são classificadas como mudanças progressivas, que aumentam a atividade das células e do tecido (BERNET et al., 1999), reduzem o espaço interlamelar e aumentam a distância entre a água e o sangue, criando uma barreira para a entrada dos agentes tóxicos (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MALLATT, 1985). Por isso surgiram logo ao início da exposição.

A hiperplasia descontrolada também pode levar à fusão total ou parcial das lamelas secundárias, reduzindo a superfície respiratória (RAJBANSHI & GUPTA, 1988) e aumentando ainda mais a distância água-sangue (MALLATT, 1985). Por este motivo a ocorrência de fusões lamelares aumentou durante o início do experimento, acompanhando as alterações proliferativas e hipertrofia.

Entretanto, o número de fusões lamelares caiu aos 21 dias de exposição na concentração mais baixa de LAS, quando as alterações que as originaram já haviam regredido, e retornou ao mesmo padrão observado no grupo controle, após 30 dias de exposição. O que ocorreu provavelmente se deve ao fato de que a fusão lamelar também pode exercer um papel na osmorregulação e balanço ácido-base nas brânquias, pois aumenta ou diminui a superfície branquial (RAJBANSHI & GUPTA, 1988) e conseqüentemente regula a disponibilidade de células ricas em mitocôndria.

As células ricas em mitocôndria são sítios ativos de transporte iônico nos peixes (PERRY, 1997) e a modulação da área de superfície apical dessas células disponível nos filamentos e lamelas branquiais para troca iônica é uma resposta comum em condições iônicas

desfavoráveis ou quando da exposição a agentes tóxicos (LAURENT & PERRY, 1991; PERRY, 1997).

Esse desequilíbrio iônico que provoca resposta nas brânquias pode ser causado pela exposição a contaminantes diretamente (CAMARGO et al., 2009; WENDELAAR-BONGA, 1997), isto é, os contaminantes podem alterar o balanço iônico do ambiente e causar os danos respiratórios e oморregulatórios. Ou as próprias mudanças histopatológicas podem desencadear distúrbios respiratórios e desequilíbrio eletrolítico nas brânquias (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

Assim, a exposição às duas concentrações de LAS em nossos experimentos afetou o balanço iônico e de ácido-base das brânquias, provocando alterações morfológicas (proliferativas, hipertróficas e fusões) que diminuíram a superfície de troca para compensar o desequilíbrio e conservar as funções fisiológicas do órgão. Entretanto, essas mesmas mudanças histopatológicas provavelmente super-compensaram no primeiro período experimental (14 dias), causaram um desequilíbrio iônico de gradiente oposto ao inicial e após 21 dias, além da reversão das hiperplasias e hipertrofias, o número de fusões lamelares teve que ser reduzido além do observado no controle para aumentar a superfície de troca iônica e re-equilibrar o balanço iônico nas brânquias (LAURENT & PERRY, 1991; PERRY, 1997).

Todas essas alterações branquiais que aumentam a distância sangue-água e a superfície branquial tem outro efeito além de criar uma barreira contra a entrada de contaminantes e provocar desequilíbrio iônico. Como consequência dessa distância criada, a difusão de oxigênio também é dificultada e gera um estado de hipóxia (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MALLATT, 1985). Dessa forma, mesmo sendo mecanismos de defesa, essas respostas geram danos na eficiência respiratória que podem sobrepor efeitos protetores (CENGIZ, 2006).

Outro ponto a ser ressaltado é que no caso da adição de um surfactante, o mesmo atua diretamente na permeabilidade de membrana das células (MARIE et al., 2000; PEREIRA, 2014; HARA & THOMPSON, 1978). Assim, as alterações que aumentam a distância sangue-água para formar uma barreira podem não serem eficazes, pois mesmo isolando a região de troca, a parte exposta permite a troca indevida de íons devido as modificações físico-químicas causadas pelo poluente na membrana das células periféricas.

Alguns autores contra-argumentam que os peixes podem aumentar a taxa de ventilação para compensar a baixa difusão de oxigênio (CAMARGO & MARTINEZ, 2007 *apud* FERNANDES & MAZON, 2003). Não obstante, a hipóxia pode afetar hematologicamente os animais e desencadear outros quadros patológicos, por exemplo, estimulando o aumento do número de eritrócitos na circulação (ZHU et al., 2002) e contribuindo para o aumento de fluxo

sanguíneo causado pela elevação metabólica para detoxificação após exposição a contaminantes (RANDALL, 1982 *apud* PAULINO, 2011).

Esse aumento de fluxo sanguíneo, por sua vez, pode promover lesões nas células pilares que controlam a circulação de sangue nas brânquias (RANDALL, 1982 *apud* PAULINO, 2011) e a ruptura ou dilatação dessas células pode levar à formação de aneurismas (MARTINEZ et al., 2004).

Assim, além das mudanças progressivas, mudanças regressivas e perturbações circulatórias podem ocorrer como resultado da exposição a contaminantes (BERNET et al., 1999). As mudanças regressivas consistem em processos que reduzem ou causam perda total da função do órgão e envolvem atrofia, degeneração e necrose; como é o caso da ruptura de células pilares (BERNET et al., 1999), que não foi observada em nossos experimentos, mas pode levar à formação de aneurismas (MARTINEZ et al., 2004), que foram observados.

Aneurismas, por sua vez, são dilatações bem definidas de vasos arteriais, classificados como perturbações circulatórias que resultam de condições patológicas de fluxo sanguíneo e fluxo de fluidos teciduais (BERNET et al., 1999). Um número elevado de aneurismas se manteve nas duas concentrações durante todo o experimento no geral; como se pode esperar, uma vez que eles podem ser considerados efeitos deletérios mais severos e não reversíveis (MARTINEZ et al., 2004; REDDY & RAWAT, 2013). Porém, demoraram mais para surgir na menor concentração de LAS, aparecendo apenas após 14 dias de experimento.

Consideramos aqui que aneurismas tem acentuada importância patológica segundo a classificação de Bernet et al. (1999), pois são comumente irreversíveis, progridem se as condições ambientais não forem alteradas, levam a danos irreparáveis ao tecido branquial (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995) e à perda total ou parcial da função do órgão (BERNET et al., 1999). Os aneurismas não são considerados respostas adaptativas ou compensatórias para evitar a entrada de contaminantes como as alterações progressivas (MALLATT, 1985; SIMONATO, et al., 2008; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995), são entendidos como lesões, ou seja, processos deletérios (MARTINEZ et al., 2004).

Todas as lesões consideradas até este ponto e outras alterações morfológicas já foram observadas por diversos autores

(CAMARGO et al., 2009; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; CERQUERA & FERNANDES, 2002; ELAHEE & BHAGWANT, 2007; MARTINEZ et al., 2004; MAZON et al., 2002; MISRA et al., 1985; PAULINO, 2011; PEREIRA, 2014; PEREIRA et al., 2012a; SIMONATO et al., 2008)

que estudaram vários contaminantes, desde metais pesados e hidrocarbonetos até surfactantes, incluindo o LAS. Estudos *in situ* não estão excluídos da lista e os testes em sua maioria são de exposição aguda (96 horas nos estudos citados). Apenas alguns exploram os efeitos da exposição crônica (pelo menos 15 dias nos estudos citados).

Diversas outras alterações que não foram observadas nesses experimentos podem se relacionar àquelas que foram observadas. Estas outras possíveis alterações morfológicas e as relações entre todas as possíveis lesões branquiais já foram compiladas por outros autores (MALLATT, 1985; REDDY & RAWAT, 2013)

O descolamento epitelial, não observado, pode levar à fusão lamelar, que foi observada, e ruptura das células do epitélio (REDDY & RAWAT, 2013), que pode ter sido a causa dos aneurismas observados. Necrose de células pilares, de células ricas em mitocôndria e de células epiteliais é mais comum quando da exposição a metais do que a poluentes orgânicos, devido à interação direta com proteínas (REDDY & RAWAT, 2013) - a necrose é um efeito grave de contaminação e não foi observada neste estudo, mas a hipertrofia, que foi observada, pode estar associada à necrose e ao inchaço celular (REDDY & RAWAT, 2013).

Aneurismas, que foram observados, e congestão sanguínea com dilatação do canal marginal geralmente acompanham infiltração de leucócitos (REDDY & RAWAT, 2013), que não foi observada, mas que configura um quadro de respostas inflamatórias em casos de estresse ambiental grave (ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002). Assim, as alterações observadas neste estudo não configuram um quadro extremamente severo, mas podem se desenvolver em quadros mais graves como exposto acima, se a exposição ao contaminante persistir.

Por fim, essas modificações não são contaminante-específicas e podem ser causadas por uma miríade de agentes tóxicos (ELAHEE & BHAGWANT, 2007; MALLATT, 1985; PAULINO, 2011; REDDY & RAWAT, 2013; TRONCOSO & CAZENAVE., 2012). Dependendo da natureza desses agentes, sua concentração, tempo de exposição e espécie em estudo, essas lesões podem variar em padrão de incidência (PEREIRA, 2014; REDDY & RAWAT, 2013).

## **6.2. Células de muco**

A primeira linha de defesa dos peixes contra contaminantes é o epitélio (WENDELAAR-BONGA, 1997) e as secreções mucosas, que aumentam quando o animal entra em contato com partículas na água (COELLO & KHAN, 1996). A maior parte do muco que recobre os peixes é produzido pelas células de muco (ZACCONE, et al., 2001), logo, alterações na densidade dessas células refletem alterações na quantidade de muco produzida.

O aumento da atividade celular em resposta à presença de contaminantes não é uma resposta específica das células mucosas; mudanças no metabolismo celular, de caráter patológico e adaptativo, tem sido descritas em vários outros tipos celulares epiteliais (células pavimentosas, células club e células ricas em mitocôndrias), compondo um padrão geral de resposta a estresse ambiental na pele (ZACCONE et al., 2001). Mas nas células mucosas, o aumento da atividade implica em aumento da síntese de muco.

Alguns autores já observaram o aumento do número de células mucosas ou da produção de muco em resposta a altas concentrações de metais durante horas ou dias (COELLO & KHAN, 1996; FUJIMOTO et al., 2008; RAJAN & BANERJEE, 1991). Outros observam redução do número de células mucosas, acompanhado do aumento no diâmetro das células (IGER et al., 1994b). Ou seja, mesmo que o número de células não aumente, costuma-se observar o aumento na produção de muco.

Nossos experimentos letais mostraram aumento no número de células mucosas nas concentrações mais altas de LAS (3.6 mg/L), denunciando aumento consequente na produção de muco, uma resposta comum. Já os experimentos não-letais resultaram no oposto.

Para explicar as situações nas quais não se observa aumento na produção de muco, Garg & Mittal (1993) argumentam que ocorrem ciclos de fases de repouso e fases de intensa atividade sintética durante a exposição a agentes tóxicos. Nesses ciclos, as células primeiro aumentam de diâmetro devido ao aumento na atividade celular para maior produção de muco e depois tem as dimensões reduzidas devido à expulsão do muco produzido de dentro das células, ou seja, depois a produção de muco cessa temporariamente. Os intervalos entre as fases de repouso e de intensa atividade representam o tempo necessário para que as células recuperem a capacidade sintética após a exaustão causada pela atividade, exageradamente aumentada no primeiro momento de exposição (GARG & MITTAL, 1993).

Esses mesmos autores postularam tais ciclos em experimentos de exposição aguda (com intervalos de horas de exposição até o limite de 72 horas) a altas concentrações de LAS (12 mg/L). Isto pode explicar a redução no número de células mucosas aqui observada. Em nossos experimentos não letais os indivíduos do grupo controle sempre apresentaram grande quantidade de células de muco, de maneira que a redução pode, sim, refletir um estado de exaustão, pois a produção de muco já era originalmente alta se comparado ao observado nos experimentos letais. Assim, provavelmente houve uma depleção da capacidade de regular essa resposta compensatória por parte dos animais nos experimentos não letais.

Além disso, a produção de muco pode ser afetada por eventos de imunossupressão, já que este exerce papel imune (ROUMBOUT et al., 1993; WENDELAAR-BONGA, 1997) e a

imunossupressão pode ocorrer em casos de estresse prolongado (TORT, 2011). O que corrobora com o argumento de depleção na capacidade de regular mecanismos de proteção devido à exposição ao surfactante.

Essas respostas que afetam a quantidade de muco produzida pela pele podem gerar efeitos em um largo espectro de funções da pele, pois o muco já foi associado com diversas atividades epiteliais. As funções que ele desempenha na pele são difíceis de determinar experimentalmente e há diversos compostos que contribuem para essas funções (ZACCONE et al., 2001). Em estudos antigos o muco já foi relacionado a diversas funções, desde respiração e regulação iônica e osmótica, à reprodução, excreção, locomoção, comunicação, alimentação e defesa (ZACCONE et al., 2001) e o papel do muco em algumas destas funções já foi confirmado por estudos mais atuais.

Sem dúvida, o muco tem um papel imprescindível como barreira de proteção contra partículas, agentes patogênicos e compostos tóxicos em peixes (BERNET et al., 1999), tanto química, quanto física. Suas propriedades de lubrificação contribuem para criar tal barreira física (FLETCHER & GRANT, 1968 *apud* COELLO & KHAN, 1995).

Além disso, esse composto forma uma camada estática que restringe a difusão da água (SHEPARD, 1981). Esse efeito pode não ser muito expressivo, pois aumenta apenas cerca de 10% da impermeabilidade do tecido (SHEPARD, 1981), mas o aumento da resistência à entrada de água produzido pelo muco também pode contribuir para formar a barreira contra a entrada dos contaminantes.

Além de formar uma barreira física contra difusão da água, as células mucosas também podem atuar sobre a permeabilidade do epitélio para regular a entrada e saída de substâncias e criar uma barreira química. Há autores que correlacionam a presença de calmodulina, um ativador enzimático que regula transporte transmembrana de  $\text{Ca}^{2+}$ , produzida pelas células de muco na pele de peixe, com o controle da permeabilidade no epitélio da pele (FLIK et al., 1984).

O muco, bem como a escama, também tem capacidade de quelar metais e outros cátions presentes na água e tamponar pHs ácidos, protegendo os animais contra a queda de pH que pode acontecer quando metais são dissolvidos na água (COELLO & KHAN, 1996).

Acredita-se, porém, que a maior parte de seu papel protetor se deve ao fato de o muco atuar como carreador de uma variedade de bioativos de defesa específicos (ZACCONE et al., 2001) em processos de comunicação e sinalização celular. A presença de imunoglobulinas no muco dos peixes (ROUMBOUT et al., 1993; WENDELAAR-BONGA, 1997) deve contribuir para essas propriedades de ligação específicas e atividade protetora em processos de resposta imune.

Alguns estudos também sugerem que as células de muco na pele de teleósteos são uma fonte de enzimas constitutivas neurais e endoteliais respostáveis pela produção de óxido nítrico (óxido nítrico sintase) (ZACCONE et al., 2001). O óxido nítrico é um radical livre altamente reativo que atua na vasodilatação (NLM, 1999), regulação da atividade de secreção de muco (BERG et al., 2004) e respostas inflamatórias e imunes (MONCADA et al., 1991).

É importante elucidar o papel das enzimas de óxido nítrico na estimulação da atividade secretora no epitélio da pele (ZACCONE et al., 2001) e isto auxilia na compreensão dos mecanismos de defesa imune nos peixes.

Portanto, funções como a proteção física, química e imune dos peixes podem ser reguladas através da produção de muco. Nossos experimentos são exemplos de como o LAS (e surfactantes em geral) podem afetar, regular e comprometer a produção de muco e, consequentemente afetar a capacidade defensiva dos animais em diversos níveis.

Acredita-se que o epitélio da pele como um todo, não apenas a camada de muco superficial é importante para a defesa alvo-específica provida pelo muco (ROMBOUT et al., 1993). Portanto, é importante avaliar os demais tipos especializados de células presentes na pele, como as células club.

### **6.3. Células club**

Células club são células secretoras epidermais multifuncionais encontradas em diversas ordens de peixes (ZACCONE et al., 2001). Já foram associadas à produção de ferormônios, atualmente chamados de substâncias de alarme (PFEIFFER, 1997; SMITH, 1992), agentes anti-patogênicos (AL-HASSAN et al., 1987 *apud* ZACCONE et al., 2001), fatores de regulação celular na epiderme (IGER et al., 1994b) e a presença de agentes estressores (BROWN, 2003; CHIVERS et al., 2007; IGER et al., 1994a; IGER et al., 1994b; HALBGEWACHS et al., 2009; MCPHERSON et al., 2004; ZACCONE et al., 2001).

Alguns autores mostram como agentes químicos podem regular a resposta às substâncias de alarme (MCPHERSON et al., 2004), outros demonstraram a diminuição ou aumento no número dessas células em amostras de pele em resposta a contaminantes, estresse mecânico ou patógenos (CHIVERS et al., 2007; HALBGEWACHS et al., 2009; RAJAN & BANERJEE, 1991) e a migração dessas células para a superfície da pele (IGER et al., 1994a; IGER et al., 1994b; RAJAN & BANERJEE, 1991), o que facilita a liberação de seu conteúdo (PFEIFFER, 1977).

Considerando que as células club parecem desempenhar um papel na resposta a agentes estressores, este deve estar relacionado aos produtos que produz e a migração para a superfície para liberação desse conteúdo é, portanto, também uma resposta de cunho protetor.

Em nosso estudo o número de células club diminuiu em relação ao controle apenas ao início e ao final do experimento na maior concentração de surfactante, mas não após 21 dias de exposição. Há evidências de que as células club tem função imune contra agentes que causem danos epidermais em geral (HALBGEWACHS et al, 2009; ZACCONE et al., 2001). A supressão do sistema imune pela presença de contaminantes conseqüentemente causa a diminuição do investimento em células club e o número dessas células na pele, cai (HALBGEWACHS et al, 2009).

Além disso, contaminantes que causem efeitos negativos na condição corporal dos peixes podem fazer com que a energia seja redirecionada das funções não essenciais, como a produção de células club (HALBGEWACHS et al, 2009), contribuindo para a redução do seu número em tecidos epiteliais. Aqui, já demonstramos que a concentração testada de LAS causa danos às brânquias e pode induzir um estado de depleção no corpo do animal, o que refletiu na produção de muco. Assim, a resposta observada aos 14 e 30 dias pode ser entendida como resultado de imunossupressão causada pela presença do LAS. Essa imunossupressão pode ter afetado não só a produção de muco, que exerce um papel imune (ROUMBOUT et al., 1993; WENDELAAR-BONGA, 1997), mas também a produção de células club.

A exposição inicial à maior concentração do surfactante provocou essa resposta. Entretanto aos 21 dias de experimento o número de células club não diferiu em relação ao controle, o que poderia ser explicado pela habituação dos animais ao composto na água. Resistência não é um fenômeno incomum em peixes de áreas urbanizadas (WIRGIN & WALDMAN, 2004). Ao final do experimento, após um longo período de tempo sem que o agente estressor fosse removido, os animais provavelmente sofreram imunossupressão novamente pela exposição prolongada ao LAS.

A exposição à menor concentração de surfactante provocou efeitos similares a partir dos 21 dias de exposição, entretanto, ao início do experimento o número de células club não caiu, mas aumentou. Concentrações menores de LAS, portanto, não causaram imunossupressão logo nos animais, apenas com a exposição prolongada.

Como já citado, mudanças no metabolismo celular tais como o aumento da atividade celular [e aumento no número de células] devido à presença de contaminantes não são respostas específicas (ZACCONE et al., 2001). Esse fenômeno tem sido descrito em vários tipos celulares epiteliais, incluindo células club, e compõem um padrão geral de resposta a estresse ambiental

(ZACCONE et al., 2001). Logo, o aumento no número de células após o primeiro contato dos peixes com as menores doses de surfactante é uma tentativa de proteger a pele das injúrias.

Como as células tem papel na resposta imune e na proteção da integridade da pele (BROWN, 2003; CHIVERS et al., 2007; HALBGEWACHS et al, 2009; IGER et al., 1994a; IGER et al., 1994b; ZACCONE et al., 2001), o aumento no número dessas células aumenta a capacidade da pele de se proteger contra efeitos danosos do surfactante e esse aumento já foi observado por outros autores (CHIVERS et al., 2007).

Ainda não se conseguiu demonstrar experimentalmente um relação causal entre a injúria ao tecido epidermal e a produção de células club. Chivers et al., (2007) postulam que o dano mecânico ao tecido seja apenas parte do estímulo à produção de células club e outros sinais químicos de agentes patogênicos ou tóxicos podem ser necessários para que haja mudanças adaptativas na química das células.

O mecanismo pelo qual essas células inibem a presença de patógenos também não foi esclarecido, mas parece haver uma relação com a imunossupressão também (CHIVERS et al., 2007). Além disso, alguns autores apontam que as células club de algumas espécies de peixe contem condroitina e queratinas (RALPHS & BENJAMIN, 1992; ZACCONE et al., 2001) que podem contribuir para o suporte mecânico do epitélio e cicatrização de tecido danificado (RALPHS & BENJAMIN, 1992).

Uma última hipótese que poderia ser levantada retoma uma teoria de outro autor que concerne células sanguíneas de peixes. As células club podem agir da mesma forma que os trombócitos, que aumentam no início da exposição a agentes contaminantes e depois diminuem, não por supressão, mas devido à substituição por células do sistema imune mais específicas (PEREIRA et al., 2012b).

Portanto, parece quase certo que as células club tem um papel importante na manutenção da integridade física da pele dos peixes e na proteção imune. Associada a outras análises do tecido epitelial, a análise de células club tem grande potencial como biomarcador.

#### **6.4. Espessura do epitélio**

A pele comumente é o alvo primário de infecções oportunistas em peixes sob condições de estresse (NOGA et al., 1998). É uma superfície de contato direto com o meio aquático (LYNG et al., 2004; SOUZA & SANTOS, 1997), que recebe estímulos e responde a alterações nesse meio (SOUZA & SANTOS, 1997). Ainda assim, há poucos estudos sobre a morfologia da pele em peixes sob condições de estresse que se foquem na espessura da pele ou do epitélio.

Kilamade & Mothersill (2000) argumentam que a pele aumenta em espessura quando da exposição a baixas concentrações e diminui quando a exposição atinge níveis maiores e doses críticas. De fato, outros autores observaram aumento na espessura em doses de surfactante que não causaram alterações branquiais severas (PRETTI et al., 2005), enquanto outros mostram a diminuição da pele acompanhando quadros mais graves de necrose (LANGER et al., 1004).

Nossos experimentos mostraram aumento da espessura do epitélio quando da exposição logo aos 14 dias de experimentação e também aos 21 dias em ambas as concentrações de LAS testadas, exceto aos 14 dias na maior concentração. Esse aumento na espessura é resultado de hiperplasia das células epiteliais.

A hiperplasia é classificada por Bernet et al. (1999) como uma mudança progressiva, que aumenta a atividade das células e dos tecidos. Nas brânquias, sua ocorrência reduz o espaço interlamelar e aumenta a distância entre a água e o sangue, criando uma barreira física para a entrada de partículas (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MALLATT, 1985) e constituindo uma resposta adaptativa ou compensatória para evitar a entrada de contaminantes (MALLATT, 1985; SIMONATO, et al., 2008; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

A hiperplasia é geralmente considerada mínima a moderadamente importante segundo a classificação de Bernet et al (1999), pois é frequentemente reversível quando o agente estressor é removido. Por este motivo o epitélio aumentou logo ao início da exposição, como mecanismo para evitar contato com o LAS, e permaneceu até que a exposição prolongada provocasse efeitos mais severos.

É importante salientar que essa modificação não é contaminante-específica e pode ser causada por diversos agentes (ELAHEE & BHAGWANT, 2007; MALLATT, 1985; PAULINO, 2011; PEREIRA, 2014; REDDY & RAWAT, 2013; TRONCOSO & CAZENAVE, 2012).

Como o agente estressor não foi removido em nossos experimentos após a ocorrência de hiperplasia, aos 30 dias de exposição às duas concentrações de surfactante testadas houve redução da espessura do epitélio. O fenômeno pode ser consequência de imunossupressão causada pelo surfactante, uma resposta mais severa que já observamos aqui, afetando a produção de muco e na produção de células club no epitélio da escama. De fato, já foi afirmado que imunossupressão pode ocorrer em condições de estresse prolongado (TORT, 2011).

Aos 14 dias de exposição à maior concentração também foi observada a diminuição na espessura do epitélio, o que pode ser devido ao choque inicial com o contato dos animais a concentrações mais altas de LAS.

Pode haver alguma relação entre a imunossupressão, estresse e quadros mais graves de infecção de pele em peixes como a ulceração. Que a imunossupressão aumenta as chances de infecção, já é sabido (TORT, 2011), no entanto, no estudo do desenvolvimento de infecções de pele em peixes, a hipótese mais aceita é de que agentes infecciosos causam danos à pele e levam à formação de úlceras, observadas em infecções associadas a patógenos (NOGA et al., 1998) Ou que em alguns casos traumas físicos danificam a pele e podem causar a infecção e úlceras, que facilitam a instalação dos patógenos (NOGA et al., 1998).

Entretanto, estes mesmos autores postulam que a ulceração pode, sim, se desenvolver sem a ocorrência de trauma e antes que qualquer agente infeccioso invada a pele. Esses autores defendem ainda que as úlceras podem ser resultados de estresse por confinamento. Ou seja, quando os animais são estressados, como observamos em nossos experimentos, eles podem ficar mais suscetíveis a infecções devido à supressão do sistema imune ou até mesmo desenvolver diretamente uma ulceração como resultado do estresse. O que mostra uma relação entre o quadro aqui observado e a possibilidade do mesmo se desenvolver em quadros mais severos.

Por fim, diversos efeitos que se observa na pele de peixes sob condições de estresse ambiental, tais como a proliferação celular e o aumento de atividade secretora observados neste estudo, podem ser modulados por cortisol (IGER et al., 1995), um regulador conhecido do sistema imune (TORT, 2011) e muito utilizado como indicador de estresse em estudos de contaminação (BARTON et al., 2002). Assim, a espessura do epitélio e sua relação com processos imunes mostram seu potencial como indicador de contaminação.

### **6.5. Experimentos de alimentação**

A alocação de energia a nível individual determina as taxas de desenvolvimento, crescimento, fecundidade e sobrevivência, que se traduzem em efeitos a níveis de organização biológica superiores, pois são componentes importantes do *fitness* e determinantes da estrutura e dinâmica da população (MALTBY, 1994).

Já foi demonstrado que limitações na alimentação por intervalos de tempo prolongado provocam efeitos como os citados sobre o crescimento e reprodução (LYNCH, 1989), mas nossos experimentos não mostraram efeitos sobre a taxa de alimentação e nossos dados apresentaram variação bastante alta.

A variação poderia ser resultado de um tamanho amostral insuficiente ( $n = 16$ , sendo todas réplicas verdadeiras), entretanto outros estudos em peixes já utilizaram tamanhos amostrais semelhantes para outra espécie de peixe ( $n = 18$ , sendo 6 réplicas verdadeiras que foram conjuntos de 3 sub-réplicas, e  $n = 24$ , sendo 8 réplicas verdadeiras que foram conjuntos de 3 sub-réplicas) (CASTRO et al., 2004; MOREIRA et al., 2010). No entanto, com tamanhos amostrais como estes, Moreira et al. (2010) não encontraram diferenças na taxa de alimentação pós-exposição ao contaminante em peixes com testes *in situ*, mas registraram depressão alimentar em estudos de laboratório para algumas concentrações de inseticida.

Poderíamos especular sobre a influência de fatores de estresse adicionais. Moreira et al. (2010) argumentam que variabilidade nos dados pode estar associada a estresse por manipulação ou períodos de aclimação insuficientes, que reduzem a taxa de alimentação; mas fazem estas premissas para testes *in situ*. Em nossos experimentos os animais foram aclimatados por duas semanas (um período bem maior do que o praticado pelos autores citados, que foi de 1h30min) e apenas lançamos o alimento dentro dos aquários diariamente, mas os animais só foram manipulados nas coletas que tinham uma semana de intervalo entre si. Assim, o estresse por manipulação foi reduzido ao mínimo possível, como é comum em testes de laboratório se comparados a testes *in situ* (MOREIRA et al., 2010).

Outra maneira de otimizar a metodologia seria de utilizar recursos alimentares naturais à espécie, para evitar que a adaptação ao alimento seja necessária (CASTRO et al., 2004), mas nossos animais passaram por um longo período (duas semanas) de aclimação sendo alimentados com a ração utilizada nos experimentos, o que deveria eliminar a variabilidade. Também é possível aumentar o número de réplicas ou sub-réplicas (MOREIRA et al., 2010), mas já utilizamos um tamanho amostral semelhante ao praticado por outros autores e composto inteiramente por réplicas verdadeiras.

Hipóteses que ainda podem ser levantadas seriam de estresse por confinamento, pois observações durante os experimentos permitiram verificar que os animais nos aquários isolados permaneciam bastante agitados. Utilizamos aquários de espaço comparável ao já praticado por outros autores: utilizamos aquários de 20 litros, em comparação com câmaras de 18L em experimentos *in situ* de Moreira et al. (2010); porém, os espécimes que utilizamos eram maiores (7 cm) do que os utilizados pelos autores citados (2 cm).

Utilizamos alimentos não contaminados, de maneira que eventuais efeitos de depressão alimentar, ou no caso a ausência dos efeitos, deveriam se relacionar a mudanças deletérias causadas pela exposição ao agente químico (MOREIRA et al., 2010). Ainda assim, interações

entre a exposição ao LAS e efeitos de estresse por confinamento podem ter colaborado para a alta variabilidade dos dados.

Os organismos ainda podem se adaptar a estresse a longo prazo (MALBY, 1994), assim a variabilidade também pode ser resultado desse período de adaptação, quando ainda observamos efeitos a nível subindividual (no caso, nas brânquias e escama) mas não mais a nível individual.

### **6.6. Efeitos do LAS e qualidade da água**

É importante lembrar que os efeitos tóxicos de substâncias químicas, incluindo o LAS, dependem da qualidade da água (HENDERSON et al., 1959; PASCOE et al., 1986; REDDY & RAWAT, 2013; VERGE et al., 2001) e elementos como metais e íons podem interagir com outros contaminantes presentes na água, principalmente surfactantes, causando efeitos sinérgicos ou aditivos que potencializam a ação tóxica sobre a fauna (BROWN et al., 1968; LIN et al., 2005; LORRIS & SHANE, 1993).

O modo como os compostos interagem pode depender da estrutura de suas moléculas ou de alterações nos processos fisiológicos do organismo (LORRIS & SHANE, 1993). Há diversos estudos sobre os efeitos de metais isolados em peixes (JEZIERSKA & WITESKA, 2006; LORRIS & SHANE, 1993). No entanto, estudos sobre os efeitos de metais combinados com outros compostos ainda são raros na literatura (PEREIRA, 2014).

Apesar de a análise química das águas mostrar diferenças em alguns elementos nos grupos expostos a LAS e também na concentração de cloro no grupo controle, são poucos os elementos elevados. O alumínio pode ter interagido com o surfactante, mas como há poucos estudos sobre a dinâmica dessas interações, não é possível isolar as interferências na histopatologia.

A concentração de cloro mais elevada no grupo controle não parece ter afetado significativamente os animais e é importante lembrar que a concentração de cloro pode ser reduzida pela circulação, filtração, luz UV e oxigenação da água durante períodos suficientemente longos (COLE & WILLIAMS, 1958; WHO, 2000) e todos os sistemas de tanque e aquários foram equipados com bombas para circular, filtrar, aplicar luz UV e oxigenar a água constantemente, que podem ter feito os níveis caírem mais durante os experimentos.

Os valores de pH todos se encontravam dentro do tolerado pelas espécies tropicais e dos padrões de qualidade para águas doces, que vai de pH 6 a 9 (CONAMA, 2005).

A forma como os surfactantes causam as lesões branquiais e epiteliais observadas provavelmente se deve às suas propriedades, que permitem a interação com lipídeos e proteínas

de membrana, solubilizando-os (MARIE et al., 2000) e afetando diretamente a estrutura das proteínas e a permeabilidade e transporte de membrana (PEREIRA, 2014; HARA & THOMPSON, 1978).

O comprometimento de funções das proteínas de membrana tais como o transporte iônico afeta funções essenciais da brânquia, como a osmorregulação, e esse comprometimento aciona os mecanismos compensatórios citados ao longo do texto (hiperplasia, hipertrofia e fusão lamelar) (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

Na pele, a exposição a detergentes, bem como a metais e outros contaminantes, também causa aumento na produção de muco e altera sua composição química e capacidade de aderir à superfície da pele (ZACCONE et al., 2001). Surfactantes atuam, portanto, na remoção do muco, devido aos efeitos na capacidade de adesão à pele, e também na desnaturação de proteínas (HARA & THOMPSON, 1978). Por isso diz-se que afetam a composição química do muco e podem comprometer todas as funções de proteção física, química e imune já discutidas em tópico anterior.

O mecanismo de ação do LAS deve se encaixar no que se espera de um detergente, entretanto, esse surfactante é presente como diferentes isômeros no ambiente aquático e cada isômero apresenta um grau diferente de ecotoxicidade (HERA, 2009). O tamanho de cadeia médio do LAS é  $C_{10,8}$  e cadeias mais curtas tendem a ser menos tóxicas, mas a ecotoxicidade total provavelmente não é a mesma que aquela associada com a média das estruturas, pois a toxicidade não é linearmente relacionada ao comprimento da cadeia, mas sim, exponencialmente relacionada (HERA, 2009). Assim, diferentes efeitos em diferentes repetições do mesmo experimento podem apenas refletir diferentes misturas de isômeros na água.

A ecotoxicidade aguda do LAS já registrada para espécies de peixes foi de 4.1 ( $S \pm 1.7$ ) mg/Le 3.2 ( $S \pm 1.6$ ) mg/L, enquanto testes de ecotoxicidade crônica em experimentos que duraram ao menos 21 dias e até 32 dias em espécies de clima tropical e temperado registraram concentrações limite de 2.3 mg/L (*Brachydanio rerio* - Zebrafish), 0.87 mg/L (*Pimephales promelas* - Fathead minnow), 3.2 mg/L (*Poecilia reticulata* - Guppy), 0.34 mg/L (*Oncorhynchus mykiss* - Rainbow trout) e 0.25 mg/L (*Tilapia mossambica* - Mozambique tilapia) (HERA, 2009).

Assim, os valores de concentração de surfactante e a duração dos experimentos apresentados pela literatura são comparáveis aos aqui executados (0.36 e 3.6 mg/L em 14, 21 e 30 dias) e provocaram efeitos ecotoxicológicos na espécie testada (*Prochilodus lineatus* - Curimbatá).

## 7. Conclusões

Os resultados para as brânquias mostram efeitos histopatológicos nas duas concentrações do surfactante em todos os tempos de exposição, porém efeitos mais graves na maior concentração. A produção de células de muco, a produção de células club e a espessura do epitélio das escamas foram sensíveis à menor concentração de LAS, mas também mostraram efeitos mais graves e consistentes apenas na maior concentração e/ou na exposição a longo prazo (30 dias). Assim, a sensibilidade das escamas comparada à das brânquias confirma seu potencial como indicador ambiental em peixes e a vantagem de se tratar de uma técnica não invasiva torna o método aqui criado uma alternativa promissora aos métodos tradicionais.

## 8. Referências bibliográficas

ABDULLAH, M. I.; BANKS, J. W.; MILES, D. L.; O'GRADY, K. T. Environmental dependence of manganese and zinc in the scales of atlantic salmon, *Salmo salar* (L) and brown trout *Salmo trutta* (L). **Freshwater Biology**, vol. 6, nº 2, p. 161-166, 1976.

ABRAHAM, M.; IGER, Y.; ZHANG. Fine structure of the skin cells of a stenohaline freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to diluted seawater. **Tissue & Cell**, vol. 33, nº 1, p. 46-54, 2001.

AGOSTINHO, M.; M. MOREIRA-SANTOS & R. RIBEIRO. A freshwater amphipod toxicity test based on post exposure feeding and the population consumption inhibitory concentration. **Chemosphere**, vol.87, p. 43-48, 2012.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. (1978). **Química orgânica**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. 961p.

ALVES, R. M. S.; PEREIRA, B. F.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CAETANO, F. H. Scale morphology of *Prochilodus lineatus* with emphasis on the scale epithelium. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 73, nº 3, p. 637-644, 2013.

ANDERSON, S.; SADINSKI, W.; SHUGART, L.; BRUSSARD, P.; DEPLEDGE, M.; FORD, T.; HOSE, J.; STEGEMAN, J.; SUK, W.; WIRGIN, I.; WOGAN, G. Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. **Environmental Health Perspectives**, vol. 102, sup 12, p. 3-8, 1994.

ARELLANO, J. M. Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1<sup>a</sup> in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **The Histochemical Journal**, vol. 33, p. 663-674, 2001.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A. R. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatã, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, vol. 26, nº 2, p. 169-174, 2004.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, 2002. 656p.

BERG, A.; REDEEN, S.; ERICSON, A. C.; SJÔSTRAND, S. E. Nitric oxide - an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. **BioMed Central – Gastroenterology**, vol. 4, nº 16, 2004.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WHALI, T.. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, vol. 22, p. 25-34, 1999.

BRITSKI, H.S. Peixes de água doce do Estado de São Paulo - Sistemática. In: **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN - Secretaria de Agricultura, p.79-108, 1972.

BROWN, E. G. Learning about danger: chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. **Fish and Fisheries**, vol. 4, p. 227-234, 2003.

BROWN, V. M.; MITROVIC, V. V.; STARK, G. T. C. Effects of chronic exposure to zinc on toxicity of a mixture of detergent and zinc. **Water Research Pergamon Press**, vol. 2, p. 255-263, 1968.

BURGUER, J.; JEITNER, C.; DONIO, M.; PITTFIELD, T.; GOCHFELD, M. Mercury and selenium levels, and selenium: mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomato mussaltatrix*) from New Jersey, USA. **Science of the Total Environment**, vol. 443, p. 278-286, 2013.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, vol. 3, n° 5, p. 327-336, 2007.

CAMARGO, M. M., FERNANDES, M. N., MARTINEZ, C. B. How aluminium exposure Promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**. vol. 94, n° 1, p. 40-46, 2009.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. *In situ* bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. **Environmental Pollution**, vol. 125, p. 325-335, 2004.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A.. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, vol. 157, p. 3025-3033, 2009.

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

CHIVERS, D. P.; WISENDEN, B. D.; HINDMAN, C. J.; MICHALAK, T. A.; KUSCH, R. C.; KAMINSKYJ, G. W.; JACK, K. L.; FERRARI, M. C. O.; POLLOCK, R. J.; HALBGEWACHS, C. F.; POLLOCK, M. S.; ALEMADI, S.; JAMES, C. T.; SAVALOJA, R. K.; GOATER, C. O.; CORWIN, A.; MIRZA, R. S.; KIESECKER, J. M.; BROWN, G. E.; ADRIAN JR., J. C.; KRONE, P. H.; BLAUSTEIN, A. R.; MATHIS, A. Epidermal "alarm substance" cells of fishes maintained by non-alarm functions: Possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. **Proceedings: Biological Sciences**, vol. 274, n° 1625, p. 2611-1619, 2007.

CHUGUNOVA, N. I. **Age and growth studies in fish**. National Science Foundation, 1963. 132 p.

CLEARWATER, S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. Bioavailability and toxicity of diet borne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, vol. 132, p. 269-313, 2002.

COELLO, W. F.; KHAN, A. Q. Protection against heavy metal toxicity by mucus and scales in fish. **Archives of environmental contamination and toxicology**, vol. 30, p. 319-326, 1996.

COLE, VOL. W.; LEWIS, W. M. The removal of residual chlorine from tap water that is to be used in aquaria. **Turtox News**, p. 204-206, 1958.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2014.

DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. **Aquatic Toxicology**, vol. 53, p. 279-289, 2001.

DE YUAN, E. C.; CAMPANA, M. Scale development of *Prochilodus lineatus* (Val.) (Pisces, Curimatidae) juveniles from the Paraná River. **Revista Hidrobiologia Tropical**, vol. 26, nº 4, p. 327-332, 1993.

DOMINGUES, W. M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 56, nº 4, p. 609-617, 1998.

DUA, A.; GUPTA, N. Mercury toxicology as assessed through fish scales. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 74, p. 1105-1110, 2005.

ELAHEE, K. B.; BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 68, p. 381-371, 2007.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. **Environmental Pollution and Fish Gill Morphology** In Val. A. L., Kapoor, B. G. (Eds.) Fish Adaptations Science Publishers, Inc. Enfield, USA, 203-231. 2003.

FLIK, G.; VAN RIJS, J. H.; WENDELAAR BONGA, S. E. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus. **European Journal of Biochemistry**, vol. 138, p. 651-654, 1984.

FRANCILLON-VIEILLOT, H.; BUFFRÉNIL, VOL.; CASTANET, J.; GÉRAUDIE, J.; MEUNIER, F. J.; SIRE, J. Y.; ZYLBERG, L.; RICQLÈS, A. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In CARTER, J. G. (ed.) Skeletan Mineralisation: Patterns, processes and evolutionary trends. New York. **Van Nostrand Reinhold** vol. 1, p. 471-530, 1990.

FUGI, R.; HAN, N. S.; AGOSTINHO, A. A. Feeding styles of five species of bottom-feeding fishes of the high Paraná river. **Environmental Biology of Fishes**, vol. 46, p. 297-307, 1996.

FUJIMOTO, R. Y.; CRUZ, C.; MORAES, F. R. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 34, nº 1, p.117- 124, 2008.

GARG, T. K.; MITTAL, A. K. Observations on the function of mucous cells in the epidermis of the cat-fish *Clarias batrachus* exposed do sodium dodecyl sulfate. **Biomedical and Environmental Sciences**, vol. 6, p. 119-133, 1993.

GOULART, M.; CALISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, nº 1, 2003.

GRIZZLE, J. M.; THIYAGARAJAH, A. Skin histology of *Rivuluso cellatus marmoratus*: apparent adaptation for aerial respiration. **Copeia**, vol. 1987, nº 1, p. 237-240, 1987.

HARA, T. J.; THOMPSON, B. E. The reaction of whitefish, *Coregonus clupeaformis*, to the anionic detergent sodium lauryl sulphate and its effects on their olfactory responses. **Water Reseach**, vo. 12, p. 893-897, 1978.

HALBGEWACHS, C. F.; MARCHANT, T. A.; KUSCH, R. C.; CHIVERS, D. P. Epidermal club cells and the innate immune system of minnows. **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 38, p. 891-897, 2009.

HENDERSON, C.; PICJERING, Q. H.; COHEN, J. M. The toxicity of synthetic detergents and soaps to fish. **Sewage and Industrial Wastes**, vol. 31, nº 3, p. 295-306, 1959.

HERA. (2009). LAS human and environmental risk assessment on ingredients of European household cleaning products: linear alkilbenzene sulphonates, LAS. CAS n. 68411-30-3, version 4.0. <<http://www.heraproject.com/riskassessment.cfm>>.

HELTSLEY, R. M.; COPE, W. G.; SHEA, G.; BRINGOLF, R. B. Assessing organic contaminants in fish: Comparison of a nonlethal tissue sampling technique to mobile and stationary passive sampling devices. **Environmental Science & Technology**, vol. 39, nº 19, p. 7601-7608, 2005.

HOGSTRAND, C.; WOOD, C. M. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implication for water quality criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 17, nº 4; p. 547-561, 1998.

IGER, Y.; ABRAHAM, M. Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. **Tissue and Cell**, vol. 29, nº 4, p. 431-438, 1997.

IGER, Y.; BALM, P. H. M.; JENNER, H. A.; WNEDELAAR-BONGA, S.E. Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, vol. 97, p. 88-98, 1995.

- IGER, Y.; LOCK, R. A. C.; JENNER, H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper. **Aquatic Toxicology**, vol. 29, p. 49 – 64, 1994a.
- IGER, Y. LOCK, A. C.; VAN DER MEIJ, J. C. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Carpio carpio*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 26, p. 342-350, 1994b.
- JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. 1ª edição. Londres: Chapman and Hall, 1995. 455p.
- JOHAL, M. S.; DUA, A. SEM study of the scales of freshwater snakehead, *Channa punctatus* (Bloch) upon exposure do endosulfan. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 52, p. 718-721, 1994.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2013. 538 p.
- JUNQUEIRA, L.C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1ª Ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.
- KILEMADE, M.; MOTHERSILL, C. An in vitro assessment of the toxicity of 2,4-dichloroaniline using rainbow trout primary epidermal cell cultures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 19, nº 8, p. 2093-2099, 2000.
- KOUMANS, J. T. M.; SIRE, J. Y. An in vitro, serum-free organs culture technique for the study of development and growth of the dermal skeleton in fish. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, vol. 32, nº 10, p. 612-626, 1996.
- KRELL, B.; M. MOREIRA-SANTOS & R. RIBEIRO. An estuarine mudsnail in situ toxicity assay based on post-exposure feeding. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol.30, p. 1935-1942, 2011.
- LAKE, J. L; RYBA, S. A.; SERBST, J. R.; LIBBY, A. D. Mercury in fish scales as an assessment method for predicting muscle tissue mercury concentration in largemouth bass. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 50, p. 539-544, 2006.
- LANGER, S. L.; VARGAS, VOL. M. F.; FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas na epiderme de *Mugil platanus* (Perciformes: Mugilidae) como resultado da ação de bactérias encontradas no rio Tramandaí, Tramandaí, RS. **In CONGRESSO INTERAMERICANO DE SAÚDE AMBIENTAL**, 1, 2004, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária – Sessão Rio Grande do Sul, 2004, p. 20.
- LANGIANO, VOL. C; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 147, p. 222-231, 2008.
- LAURENT, P.; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiological Zoology**, vol. 64, nº. 1, p. 4-25, 1991.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**. vol. 23, nº. 4, p. 863-870, 2001.

LIN, Z.; PING, Z.; KONG, D.; YIN, K.; CAI, Z. The ratios of individual chemicals in a mixture determine the degree of joint effect: the climax hypothesis. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 49, p. 1-8, 2005.

LOPES, I.; M. MOREIRA-SANTOS, E.M. DA SILVA, J.P. SOUSA, L. GUILHERMINO, A. M. VOL. M. SOARES & R. RIBEIRO. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Chemosphere**, vol.67, p. 2250-2256, 2007.

LOPES, I.; M. MOREIRA-SANTOS, J. RENDÓN-VON OSTEN, D.J. BAIRD, A. M. VOL. M. SOARES & R. RIBEIRO. Suitability of five cladoceran species from Mexico for in situ experimentation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 74, p. 111-116, 2011.

LORRIS, G. C.; SHANE, B. S. (1993) **Basic environmental toxicology**. 1ªedição. London: CRC Press, 1993. 640p.

LYNCH, M. The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*. **Ecology**, vol. 70, nº 1, p. 246-256, 1989.

LYNG, F. M.; LYONS-ALCANTARA, M. OLWELL, P.; NÍ SHUILLEABHÁIN, S.; SEYMOUR, C.; COTTEL, D. C.; MOTHERSILL, C. Ionizing radiation induces a stress response in primary cultures of rainbow trout skin. **Radiation Research**, vol. 162, nº 2, p. 226-232, 2004.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e Saúde**, vol. 1, nº 1, p. 63-76, 1999.

MADUENHO, L. P.; MENDES, J. P.; MARTINEZ, C. B. R. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007. Caxambu. *Anais...* Caxambu, 2007, p. 1-2.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, vol. 42, p. 630-648, 1985.

MALTBY, L. **Stress, shredders and streams: Using Gammarus energetics to assess water quality**. In Sutcliffe DW, ed, Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems - Linking Levels of Organisation, Individuals, Populations and Communities. Freshwater Biological Association, Windermere, UK, p. 98-110, 1994.

MARIE, M.; CHAMPEIL, P.; MOLLER, J. VOL. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1508, p. 86-111, 2000.

- MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 113A, n° 1, p. 151- 160, 2002.
- MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 64, p. 797-807, 2004.
- MAZON, A.F.; MONTEIRO, E. A. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to cooper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 63, p. 621-631, 2002.
- MCCART, P. Scale regeneration in the bluespot goby, *Coryphopterus nicholsi*. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, vol. 24, n° 2, p. 433-434.
- MCPHERSON, T. D.; MIRZA, R. S.; PYLE, G. G. Responses of wild fishes to alarm chemicals in pristine and metal-contaminated lakes. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 82, n° 5, p. 964-700, 2004.
- MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Application of post exposure feeding depression bioassays with *Daphnia magna* for assessment of toxic effluents in rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 21, n° 7, p. 1462-1468, 2002.
- MESCHIATTI, A. J.; ARCIFA, M. S. A review on the fish fauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies. **Acta Limnologica Brasileira**, vol. 21, n° 1, p. 135-159, 2009.
- MISRA, VOL.; CHAWLA, G.; KUMAR, VOL.; LAL, H.; VISWANATHAN, P. N. Effect of linear alkyl benzene sulphonate in skin of fish fingerlings (*Cirrhina mrigala*): Observations with scanning electron microscope. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 13, p. 164-168, 1987.
- MITTAL, A. K.; WHITEAR, M. Keratinization of fish skin with special reference to the catfish *Bagarius bagarius*. **Cell and Tissue Reseach**, vol. 202, p. 213-230, 1979.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, vol. 43, n° 2, p. 109-142, 1991.
- MOREIRA, S. M.; M. MOREIRA-SANTOS, L. GUILHERMINO & R. RIBEIRO. A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hedistedi versicolor* (Polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol.24, p. 2010-2018, 2005.
- MOREIRA, S. M.; MOREIRA-SANTOS, M.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. **Environmental Pollution**, vol. 139, p. 318-329, 2006.
- MOREIRA, S. M.; M. MOREIRA-SANTOS, J. RENDÓN-VON OSTEN, E. M. DA SILVA, R. RIBEIRO, L. GUILHERMINO & A. M. VOL. M. SOARES. Ecotoxicological tools for

the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 73, p. 893-899, 2010.

MOREIRA-SANTOS, M.; A.L. FONSECA, S. M. MOREIRA, J. RENDÓN-VON OSTEN, E.M. DA SILVA, A. M. VOL. M. SOARES, L. GUILHERMINO & R. RIBEIRO. Short-term sublethal (sediment and aquatic roots of floating macrophytes) assays with a tropical chironomid based on post exposure feeding and biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol.24, p. 2234-2242, 2005.

MOSS, M. L. The vertebrate dermis and the integumental skeleton. **American Zoologist**, vol. 12, nº 1, p. 27-34, 1972.

MUGIYA, Y.; HAKIMORI, T; HATSUTORI, K. Trace metal incorporation into otoliths and scales in the goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 99C, nº 3, p. 327-331, 1991.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Anionic surfactants in treated sewage and sludges: Rsk assessment to aquatic and terrestrial environments. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 2919-2929, 2008.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 63, p. 981-987, 2009.

NOGA, E. J.; BOTTS, S.; YANG, M. S.; AVTALION, R. Acute stress induces skin ulceration in striped bass and hybrid bass (*Morone*). **Veterinary Pathology**, vol. 35, nº 2, p. 102-107, 1998.

NOLAN, D. T.; NABBEN, I.; LI, J.; WENDELAAR BONGA, S. E. Characterization of primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin explants: growth, cell composition, proliferation, and apoptosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, vol. 38, nº 1, p. 14-24, 2002.

NLM, 1998. National Library of Medicine. **Toxicology Data Network –Hazardous Substances Data Bank: Nitric Oxide**. Disponível em: < <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~tpucpa:1>>. Acesso em: 08 de dezembro de 2014.

ORR, R. T. (1908). **Biologia dos Vertebrados**. 5ª Edição. São Paulo: Livraria Roca Ltda., 1986. 508p.

PANFILI, J.; DE PONTUAL, H.; TROADEC, H.; WRIGHT, P. J. (2002). **Manual of fish sclerochronology**. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, 464 p.

PASCOE, D.; EVANS, S. A.; WOODWORTH, J. Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 15, p. 481-487, 1986.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. **Técnicas de Citologia e Histologia**. 2 Vols. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 469p.

PAULINO, M. G. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 2011. 98 f.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4ª Edição. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1985. 1055p.

PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, vol. 40, p. 783-786, 2009.

PEREIRA, B. F.; ALVES, R. M. S.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CAETANO, F. H. Morphological Gill analysis of fish species *Prochilodus lineatus* after exposure to pollutants. **Environmental & Analytical Toxicology**, vol. 2, nº 3, p. 130, 2012a.

PEREIRA, B. F.; ALVES, R. M. S.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CAETANO, F. H. Effects of exposition to polluted environments on blood cells of the fish *Prochilodus lineatus*. **Microscopy Research and Technique**, vol. 75, p. 571-575, 2012b.

PEREIRA, B. F. **Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce de brânquias e fígado em peixes**. 2014. 116 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2014.

PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, vol. 59, p.325-47, 997.

PFEIFFER, W. Distribution of frigth reaction and alarm substance cells in fishes. **Copeia**, vol. 1977, nº 4, p. 653 – 665, 1977.

POUGH, H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. 4ª Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2008. 684p.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, vol. 246, nº 4928, p. 352-358, 1989.

PRETTI, C.; CHIAPPEC, C.; PIERACCINI, D.; GREGORI, M.; ABRAMO, F.; GIANFRANCA, M.; INTORRE, L. Acute toxicity fo ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of the Royal Society of Chemistry**, vol. 8, p. 238-240, 2008.

PROSSER, C. L.; LIMBACH, B.; BENNETT, G. W.; JAMES, M. F. Responses of fish melanophores to chemical warfare agents. **Physiological Zoology**, vol. 20, nº 4, p. 349-354, 1947.

QUIRÓS, L.; RALDÚA, D.; NAVARRO, A.; CASADO, M.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. A noninvasive test of exposition to toxicants: quantitative analysis of cytochrome P4501A expression in fish scales. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 26, nº 10, p. 2179-2186, 2007.

- RAJAN, M. T.; BANERJEE, T. K. Histopathological changes induced by acute toxicity of mercuric chloride on the epidermis of freshwater catfish – *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Ecotoxicology and Environmental safety**, vol. 22, p. 139-152, 1991.
- RAJBANSHI, VOL. K.; GUPTA, A. K. Alterations in the architecture of the gill surface produced by water-borne copper in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Acta Hydrochimica et hydrobiologica**, vol. 16, n° 3, p. 325-331, 1988.
- RALPHS, J. R.; BENJAMIN, M. Chondroitin and keratin sulphate in the epidermal club cells of teleosts. **Journal of Fish Biology**, vol. 40, n° 3, p. 473-475, 1992.
- RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environmental International**, vol. 27, p. 27-33, 2001.
- REDDY, P. B.; RAWAT, S. S. Assessment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol. **International Research Journal of Environmental Sciences**, vol. 2, n° 2, p. 79-82, 2013.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, vol. 17 p. 208-212. 1963.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- RISHI, K. K.; JAIN, M. Effect of toxicity of cadmium on scale morphology in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 60, p. 323-328, 1998.
- ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 49 n° 3, 2006.
- ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDONES, F. J.; ROSETY, M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the gills of Turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulphate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 51, p. 223-228, 2002.
- ROUMBOUT, J. H. W. M.; TARVERNE, N.; VAN DE KAMP, M.; TAVERNE-THIELE, A. J. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.) **Developmental and Comparative Immunology**, vol. 17, p. 309-317, 1993.
- SANTANA, L. M. B. M. **Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR)**. 2004. 67 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2004.

SANTOS, G. B.; BARBIERI, G. Idade e crescimento do “Piau Gordura”, *Leporinus piau* Fowler, 1941, na represa de Três Marias (Estado de Minas Gerais) (Pisces, Ostariophysi, Anostomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 54, nº 4, p. 649-658, 1993.

SAUER, G. R.; WATABE, N. Zinc uptake and its effect on calcification in the scales of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Aquatic Toxicology**, vol. 5, p. 51-66, 1984.

SAUER, G. R.; WATABE, N. Temporal and metal-specific patterns in the accumulation of heavy metals by the scales of *Fundulus heteroclitus*. **Aquatic Toxicology**, vol. 14, p. 233-248, 1989.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-relevant stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, vol. 6, p. 75-86, 1997.

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of water across fish epidermis. *Physiological Zoology*, vol. 54, nº 2, p. 224-229, 1981.

SIGMA-ALDRICH. Sodium dodecylbenzenesulfonate 289957 ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/289957?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2015.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. vol. 69, p.112-120, 2008.

SMITH, R. J. F. Alarm signals in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, vol. 2, p. 33-63, 1992.

SIRE, J. Y.; ALLIZARD, F.; BABIAR, O.; BOURGUIGNON, J.; QUILHAC, A. Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Anatomy**, vol. 190, p. 545-561, 1997.

SIRE, J. Y.; AKIMENKO, M. A. Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Developmental Biology**, vol. 48, p. 233-247, 2004.

SIRE, J. Y.; HUYSEYNE, A. Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. **Biological Reviews**, vol. 78, p. 219-249, 2003.

SOARES, S.; CATIVA, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. VOL. M.; RIBEIRO, R. A short-term sublethal *in situ* sediment assay with *Chironomus riparius* based on post exposure feeding. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 49, p. 163-172, 2005

SOUZA, M. L. R.; DOURADO, D. M.; MACHADO, S. D.; BUCCINI, D. F.; JARDIM, M. I. A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I. C. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistência. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 32, nº 6, p. 1551- 1559, 2003a.

- SOUZA, M. L. R.; GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; FARIA, R. H. S.; WAGNER, P. M.; POVH, J. A.; FERREIRA, I. C. Histologia da pele de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência de couro. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, vol. 25, nº 1, p. 37- 44, 2003b.
- SOUZA, M. L. R.; SANTOS, H. S. L. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz. **Revista UNIMAR**, vol. 31, nº 3, p. 881- 888, 1997.
- SPERRY, D. G.; WASSERSUG, R. J. A proposed function for microridges on epithelial cells. **The Anatomical Record**, vol. 185, p. 253-258, 1976.
- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. (1979). **Zoologia Geral**. 6ª Edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2007. 816 p.
- SUZUKI, N.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, K.; KAMEGAWA, A.; HATTORI, A. Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, vol. 22, p. 439-446, 2004.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An Atlas of fish histology: Normal and pathological features. 2 ed., Tokio. **Kodanska**, 1995.
- TOLEDO-FILHO, S. A.; GODOY, M. P.; SANTOS, E. P. Curva de migração do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) na bacia superior do Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 46, nº 2, p. 447-452, 1986.
- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, vol. 35, p. 1366-1375, 2011.
- TRONCOSO, I. C.; CAZENAVE, J. Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 38, p. 693-702, 2012.
- UEHARA, K.; MIYOSHI, M.; MIYOSHI, S. Cytoskeleton in microridges of the oral mucosal epithelium in the carp, *Cyprinus carpio*. **The Anatomical Record**, vol. 230, p. 164-168, 1991.
- VERGE, C.; MORENO, A.; BRAVO, J.; BERNA, J. L. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Chemosphere**, vol. 44, p. 1749-1757, 2001.
- WATERMAN, R. E. Fine structure of scale development in the teleost, *Brachydanio rerio*. **The anatomical record**, vol. 168, nº 3, p. 361-379, 1970.
- WENDELAAR-BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, vol. 77, nº 3, p. 592-625, 1997.
- WIRGIN, I.; WALDMAN, J. R. Resistance to contaminants in North American fish populations. **Mutation Research**, vol. 552, p. 73-100, 2004.

WHO. World Health Organization. **Managing water and air quality**. In Guidelines for safe recreational-water environments, vol. 2 p. 5-21, 2000.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G.; FASULO, S.; AINIS, L. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. **Advances in marine biology**, vol. 40, p. 255-348, 2001.

ZHU, D.; ORTEGA, C. F.; MOTAMEDI, R.; SZEWCIW, L.; VERNEREY, F.; BARTHELAT, F. Structure and mechanical performance of a “modern” fish scale. **Advanced Engineering Materials**, vol. 14, n° 4, p. 185-194, 2012.

ZHU, H.; JACKSON, T.; BUNN, H. F. Detecting and responding to hypoxia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 17, p. 3-7, 2002.

## 9. Anexos

## 9.1 Anexo I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica – H<sub>2</sub>L

## RELATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS

Interessado: Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano

Material Entregue Declarado: Água

Natureza do Trabalho: Diversas Determinações

Referência: 03 amostras entregues por Rebeca, abaixo identificadas

### RESULTADOS:

H <sub>2</sub> L	Amostra	Temp.	Cond.	pH	Alcalinidade	
No.	Identif.	°C	µS/cm		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
					mg/L	mg/L
6594	D2	25	339	8,15	131	ND
6595	D1	25	399	8,38	145	15,2
6596	Controle	25	412	8,05	103	ND

H <sub>2</sub> L	Amostra	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Acetato	Br <sup>-</sup>
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	D2	0,19	13,5	0,37	41,8	2,57	6,91	< 0,10	3,13	< 0,030
6595	D1	0,24	11,9	0,45	45,7	3,70	13,7	< 0,10	3,23	< 0,030
6596	Controle	0,17	44,2	0,45	49,8	3,77	6,40	< 0,10	3,81	< 0,030

H <sub>2</sub> L	Amostra	Li	Na	NH <sub>4</sub>	K	Al	Ba	Be	Ca
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	D2	< 0,010	42,8	< 0,050	3,06	0,052	0,051	< 0,005	24,8
6595	D1	< 0,010	52,2	< 0,050	2,91	0,080	0,063	< 0,005	29,1

6596	Controle	< 0,010	58,4	< 0,050	3,28	0,017	0,057	< 0,005	22,2
------	----------	------------	------	------------	------	-------	-------	------------	------

H2L No.	Amostra Identif.	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L	Mg mg/L	Mn mg/L
6594	D2	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,05	< 0,001
6595	D1	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,68	< 0,001
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	3,78	< 0,001

H2L No.	Amostra Identif.	Mo mg/L	Ni mg/L	P mg/L	Pb mg/L	Si mg/L	Sn mg/L	Sr mg/L	V mg/L	Zn mg/L
6594	D2	< 0,005	< 0,003	1,64	< 0,005	0,43	< 0,005	0,11	0,014	0,009
6595	D1	< 0,005	< 0,003	2,07	< 0,005	0,82	< 0,005	0,13	0,016	0,007
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	2,24	< 0,005	0,63	< 0,005	0,098	0,016	0,010

ND: valor não detectado

- O Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica foi proficiente nos Programas de Ensaio de Proficiência PEP 005/2011 e PEP 006/2011 para os analitos Ca, Pb, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Ni, Sb, Al, Ba, Mo, Sn, Li, Sr, Cl, F, SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, P<sub>total</sub>, NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>, Dureza Total. Os Programas de Ensaio de Proficiência foram organizados pelo CETIND – Centro de Tecnologia Pedro Ribeiro (FIEB-SENAI) Provedor de Ensaio de Proficiência Habilitado pela ANVISA.

- Os cátions Na, K, Li, NH<sub>4</sub> e os ânions acetato e oxalato foram analisados por Cromatografia Iônica (IC).

Parâmetro Analítico	Método Analítico
Alumínio, Bário, Berílio, Cálcio, Cádmio, Cobalto, Crômio, Cobre, Ferro, Magnésio, Manganês, Molibdênio, Níquel, Fósforo, Chumbo, Silício, Estanho, Estrôncio, Vanádio, Zinco.	SMEWW 3120B
Fluoreto, Cloreto, Nitrito, Nitrato, Fosfato, Sulfato, Brometo	EPA 300.0 – 300.1
pH (a 25°C)	SMEWW 4500 H B
Alcalinidade	SMEWW 2320B
Dureza	SMEWW 2340B
Cor	SMEWW 2120C
Turbidez	SMEWW 2130B
Condutividade	SMEWW 2510B

Quím. Responsável: MSc. Mirtis I. Ariza Malagutti - CRQ: Pr. 23.478/81

Rio Claro, 11 de maio de 2014.

MSc. Mirtis Irene Ariza Malagutti

Parâmetro	LQ H <sub>2</sub> L (mg L <sup>-1</sup> )	VMP		Parâmetro	LQ H <sub>2</sub> L (mg L <sup>-1</sup> )	VMP	
		RDC 274 (mg L <sup>-1</sup> )	Portaria 2914 (mg L <sup>-1</sup> )			RDC 274 (mg L <sup>-1</sup> )	Portaria 2914 (mg L <sup>-1</sup> )
Cátions				Ânions			
Alumínio	0,005	---	0,2	Acetato	0,10	---	---
Bário	0,001	0,7	0,7	Bicarbonato	2,00	---	---
Cádmio	0,005	0,003	0,005	Bromato	0,015	---	0,025
Cálcio	0,003	---	---	Brometo	0,030	---	---
Chumbo	0,005	0,010	0,01	Carbonato	2,00	---	---
Cobalto	0,003	---	---	Cloreto	0,010	---	250
Cobre	0,004	1	2	Clorito	0,015	---	0,2
Cromo	0,003	0,05	0,05	Fluoreto	0,010	---	1,5
Estrôncio	0,005	---	---	Fosfato	0,040	---	---
Ferro	0,005	---	0,3	Nitrato	0,040	50	10*
Lítio	0,010	---	---	Nitrito	0,020	0,02	1*
Magnésio	0,002	---	---	Oxalato	0,10	---	---
Manganês	0,001	0,5	0,1	Sulfato	0,020	---	250
Níquel	0,003	0,02	---				
Potássio	0,030	---	---				
Silício	0,06	---	---				
Sódio	0,015	---	200				
Vanádio	0,003	---	---				
Zinco	0,005	---	5				

Observações:\* Calculado como N; VMP – valor máximo permitido; LQ – limite de quantificação

## 9.2 Anexo II



### *Global Análise e Consultoria*

*Rua: Santos Dumont, 800  
CEP: 13566-445, Vila Celina  
São Carlos-SP  
Telefone: (16)3361-3213, ramal 220*

## **Estudo do Ácido Dodecylbenzene Sulfônico - LAS**

Estudo/Ativo: LAS

Solicitante: Rebeca Alves

Endereço: UNESP- Rio Claro

Código do Estudo: Amostra de água

Realização/Unidade Operacional: Global Análise & Consultoria

Responsável pelo estudo: Dra Dalva Aparecida de Souza

Endereço: Rua Santos Dumont, 800 São Carlos/ SP

Estudo: 17/04/2014

### **-Determinação da concentração LAS**

#### *-Análises Cromatográficas*

O equipamento utilizado para as análises cromatográficas foi um HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de Fluorescência.

Foi detectada uma série de quatro homólogos,

Tabela1: Concentração do LAS

<b>AMOSTRA</b>	<b>Concentração-mg/L</b>
D1	0,027
D11	0,34
D12	0,38
D13	0,41
D21	3,51
D22	3,62
D23	3,72

---

Dra. Dalva Aparecida de Souza

CRQ04160236