UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Isabela Gertrudes Batalhão

Influência das substâncias húmicas aquáticas na genotoxicidade dos metais em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

São José do Rio Preto
2014

Isabela Gertrudes Batalhão

Influência das substâncias húmicas aquáticas na genotoxicidade dos metais em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação da Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto
2014

Isabela Gertrudes Batalhão

Influência das substâncias húmicas aquáticas na genotoxicidade dos metais em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação da Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Lilian Castiglioni
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP
Orientadora

Prof. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP-São José do Rio Preto

Prof. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales
UNESP- Rio Claro

São José do Rio Preto
21 de Fevereiro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Edson e Eliana, pelo amor, incentivo e compreensão de todos os dias, pela educação que me deram e pelo exemplo que será para uma vida toda. Dedico também a minha irmã, Jaqueline pelo amor e companheirismo, e a Alice, que me traz tanta felicidade. Amo vocês.

Valeu?
Claro que valeu!!
Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.
(Henfil)

Agradecimentos

À Deus, pelo caminho que escolheu pra mim, pela sabedoria, discernimento, paciência e vontade de vencer que Ele me concede todos os dias da minha vida.

À Prof. Dra. Lilian Castiglioni, por ter aceitado me orientar.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, meus agradecimentos pelos ensinamentos, incentivo, confiança e paciência de todos os dias.

À Prof. Dra. Márcia Cristina Bisinoti, por ter aceitado a parceria com este trabalho.

À Mestra Flávia Cristina Martins, Nayrê, Henrique e Bruna que me ajudaram com a montagem dos experimentos.

À Prof. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas, por ceder os peixes dos experimentos.

À Dra Lucilene Regina Maschio, pelo incentivo e ensinamentos diários, agradeço pelas noites que passou me ajudando a analisar as lâminas, pela amizade comigo e com toda a minha família e pela Laura que nos traz tanta alegria.

Aos técnicos Rose e Carlos, por ajudarem nas coletas dos peixes.

À técnica Cintya Vieira, por ajudar em todas as etapas dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções do trabalho.

Ao Mestre Danilo Humberto Grunning, por me ajudar com a estatística.

À Mestra Aline Cristina Rodrigues, por tudo que me ensinou durante a realização deste trabalho, pela tranquilidade que me passa, pelos desabafos diários e amizade adquirida.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática pela ajuda com os experimentos, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

Às Mestras Andréia Arantes Felício, Lilian Nogueira e Daína de Lima, que mesmo de longe sempre torceram para que tudo desse certo.

Ao meu cunhado João Paulo, pelas caronas nos dias mais corridos no laboratório.

Ao meu namorado Fabrício, pelo amor, paciência e incentivo, me dando forças para nunca desistir.

Aos meus pais, Edson e Eliana, e à minha irmã Jaqueline, pelo amor de todos os dias, pela paciência e ajuda nos meus dias de estresse e ansiedade, por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia. Amo muito vocês.

À todos os amigos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente 357/2005 estabelece concentrações limites para alguns metais presentes no ambiente aquático. Porém estes limites são considerados para os metais isoladamente, e esses raramente ocorrem de forma isolada no ambiente, estando os organismos aquáticos expostos a misturas deles. Deste modo, é de suma importância predizer o impacto que os poluentes causam nos organismos, considerando as interações entre eles. Também, outras substâncias presentes no meio aquático podem interferir na biodisponibilidade de compostos tóxicos para os organismos aquáticos. Entre elas, as substâncias húmicas aquáticas (SHA) são importantes para estudos de toxicologia, uma vez que possuem a capacidade de se complexar com as espécies metálicas e as tornarem menos tóxicas aos organismos que habitam os ecossistemas aquáticos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se os metais (Fe, Cd, Cu e Pb), de forma isolada e em mistura, em concentrações limite para valores recomendados para águas de Classe 3 de acordo com a resolução do CONAMA 357/2005, na ausência e na presença de 1,5mg/L e 5mg/L de SHA, são capazes de gerar efeitos genotóxicos e bioquímicos em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença significante no teste do micronúcleo para nenhum dos experimentos realizados, quando comparado com o controle negativo, portanto os metais não apresentaram efeitos mutagênicos nos peixes, mas apresentaram efeitos genotóxicos, uma vez que houve aumento das anormalidades nucleares para o experimento na ausência de SHA e para o experimento com 1,5 mg/L de SHA, sendo que o mesmo não ocorreu para o experimento com 5mg/L de SHA, o que nos mostrou a capacidade de complexação da SHA com os metais. Pelo teste do ensaio do cometa foi notada uma diminuição significativa da porcentagem de DNA na cauda dos cometas nos animais tratados com Pb, Cd e mistura de metais do experimento na ausência de SHA. Dessa forma, deve-se levar em conta que, após 7 dias de exposição, os animais puderam ativar mecanismos de defesa e reparo contra as lesões em DNA. Os dados de malondialdeído (MDA) também se mostraram de acordo com o papel protetor das SHA contra os efeitos negativos dos metais, pois foi notado que a adição de SHA suprimiu o aumento do MDA nos animais tratados com Pb, para as duas concentrações de SHA testadas, e com Cd para os animais tratados com 1,5 mg/L de SHA. Portanto, concluímos que os metais, mesmo em concentrações recomendadas pela lei, podem causar alterações genotóxicas e bioquímicas nos organismos, e que as SHA podem se complexar com os metais, diminuindo os efeitos tóxicos dos mesmos.

Palavras-chave: metais, substância húmica aquática, biomarcadores genotóxicos, biomarcadores bioquímicos e *Oreochromis niloticus.*

ABSTRACT

The resolution of the National Council on the Environment establishes limits concentration for metals in natural aquatic environments. However, these limits are consider to metals isolated, and these rarely occur isolated in the environment, have being aquatic organisms exposed to mixtures of them. Thus, it is extremely important to predict the impact of pollutants on organisms, considering the interactions between them. In addition, other substances into the aquatic environment may affect the bioavailability of toxic compounds to aquatic organisms. Among them, the aquatic humic substances (AHS) are important for toxicology studies, they have the ability to complex with the metal species and become less toxic to aquatic organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate if the metals (Fe, Cd, Cu and Pb) isolated and in mixtures, at the limit concentrations recommended for water class 3 by CONAMA resolution, in the absence and presence of 1.5 mg/L and 5 mg/L AHS can cause genotoxic and biochemical effects in species of the fish *Oreochromis niloticus*, after 7 days exposure. The results indicated no significant difference in the micronucleus test, for any of the experiments, when compared to the negative control, so the metals did not show mutagenic effects in fish. However, the experiment showed genotoxic effects, because we observed increase in nuclear abnormalities for the experiment in the absence of AHS and the experiment with 1.5 mg/L of HAS. The same was not occur for the experiment with 5 mg/L of AHS which showed us the formation of the complex between the metals and the AHS. The test of the comet assay was observe a significant decrease in the percentage of DNA in the tail of comets in animals treated with Pb, Cd and mixture of metals, in the experiment in the absence of AHS. Therefore, we saw that after 7 days of exposure, the animals were able to activate defense mechanisms and repair against injury in DNA. The malondialdehyde (MDA) data were also in accordance with the AHS protective role against the negative effects of metals, because it was notice that the addition of AHS suppressed the increase of MDA in animals treated with Pb for the two concentrations tested AHS and Cd for animals treated with 1.5 mg/L AHS. Therefore, we conclude that the metals even at concentrations recommended by the law can cause genotoxic and biochemical alterations in the organism and the AHS may complex with metals decreasing the toxic effects.

Key-words: metals, aquatic humic substances, biochemical biomarkers, genotoxic biomarkers and *Oreochromis niloticus.*

Lista de ilustrações

Figura 1 - Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto. 18

Figura 2 - Imagens do ensaio do cometa. 19

Figura 3 - Espécie de peixe *Oreochromis niloticus.* 28

Figura 4 - Delineamento experimental do experimento sem SHA (A) e dos experimentos com SHA (B). 29

Figura 5 - Esquema de um cometa. 31

Figura 6: Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a 1,5 mg/L de SHA. 33

Figura 7- Médias e desvio padrão de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares, encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência ou na presença de 1,5 e 5 mg/L de SHA. 34

Figura 8- Médias e desvio padrão do comprimento da cauda(µm) dos cometas encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA. 36

Figura 9- Médias e desvio padrão do comprimento da % de DNA na cauda dos cometas encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA. 36

Figura 10-Valores de MDA expressos em porcentagem em relação ao controle encontrados em brânquias de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA, na presença de 1,5 mg/L de SHA e 5mg/L de SHA. 37

Lista de tabelas

Tabela 1- Incidência de anormalidades nucleares (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência substância húmica aquática. 35

Tabela 2- Incidência de anormalidades nucleares (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na presença de 1,5 mg/L de substância húmica aquática. 35

Tabela 3- Incidência de anormalidades nucleares (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na presença de 5 mg/L de substância húmica aquática. 35

Abreviaturas e siglas

AN	Anormalidades Nucleares
Cd	Cádmio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
Pb	Chumbo
SHA	Substância húmica aquática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição ambiental **14**

1.2 Biomarcadores de contaminação aquática **15**

1.2.1 Parâmetros genotóxicos 16

1.2.1.1 Teste do micronúcleo 16

1.2.1.2 Ensaio do Cometa 19

1.2.2 Peroxidação lipídica 20

1.3 Toxicidade dos metais **21**

1.4 Substância Húmica Aquática **23**

1.5 Peixes como organismo teste **24**

1.6 Resolução nº 357 do Conselho do Meio Ambiente (CONAMA) **25**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral **26**

2.2 Objetivos específicos **26**

3 JUSTIFICATIVAS E CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A PROPOSTA DO TRABALHO **26**

4 MATERIAIS E MÉTODOS **27**

4.1 Material biológico **27**

4.2 Exposição laboratorial a misturas de metais e a metais isolados **28**

4.3 Extração e caracterização de substância húmica aquática do Rio Preto **29**

4.4 Descarte dos resíduos gerados e da água contaminada **29**

4.5 Teste do Micronúcleo **30**

4.6 Ensaio do Cometa **30**

4.6.1 Dificuldades encontradas com a técnica do ensaio do cometa 31

4.7 Peroxidação lipídica **32**

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS **32**

6 RESULTADOS **33**

6.1 Micronúcleos **33**

6.2 Anormalidades nucleares **33**

6.3 Ensaio do cometa **36**

6.4 Avaliação da peroxidação lipídica **37**

7 DISCUSSÃO **37**

8 CONCLUSÕES **41**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA **41**

ANEXOS **51**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição aquática

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão, como efluentes industriais, drenagem e descartes agrícola e esgotos domésticos (RASHED, 2001). Estas substâncias, que podem ser de origem natural ou produzidas pelo homem, são chamadas de "xenobióticos" (do termo grego *xenos*= estranho; *bio*= vida), e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1998; RAMSDORF, 2007). Uma vez que grande parte dessas substâncias podem ser potencialmente genotóxicas e carcinogênicas (JHA, 2004), elas podem comprometer a saúde dos seres vivos que habitam os diferentes ecossistemas (CAJARAVILLE, 2000), além de causar riscos diretos e indiretos para a saúde humana (AL-SABTI et al., 1994).

A poluição dos recursos hídricos por compostos químicos é um grave e crescente problema que, apesar da existência de legislações específicas com o intuito de minimizarem os impactos aos ecossistemas, continua a ocorrer de forma indiscriminada (CLAXTON et al, 1998; WHITE; RASMUSSEN, 1998). Consequentemente, centenas de poluentes estão presentes nos ambientes aquáticos cujos efeitos são desconhecidos e, portanto, preocupantes (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

No ecossistema aquático, os metais têm recebido uma atenção considerável, devido à sua toxicidade e acúmulo na biota (SAJWAN et al, 2008). Quando ocorre uma exposição intensa de um organismo a esses poluentes, é ativada uma cascata de respostas fisiológicas, que promove alterações em enzimas ou funções celulares, afetando a integridade celular, alterando as taxas de secreção hormonal e também as rotas energéticas (MALTBY e NAYLOR, 1990; TONISSI, 2009). Muitos metais causam expressivos efeitos no nível celular, podendo inclusive levar a danos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (RISSO-DE FAVERNEY et al., 2001).

Em ambientes aquáticos, vários organismos, tais como esponjas, moluscos, crustáceos, poliquetos, anfíbios e, principalmente, os peixes, têm sido utilizados como bioindicadores da toxicidade de poluentes (LEMOS et al., 2005). Os peixes reúnem ainda características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizados, pois alertam sobre o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (POWERS, 1989).

Considerando todos os efeitos que os metais podem causar em organismos não alvo, faz-se necessária a busca de ferramentas eficazes para estudos de monitoramento ambiental, a fim de detectar e minimizar essas potenciais fontes de contaminação. Uma ferramenta útil no monitoramento de ambientes aquáticos, que podem ser alvo da contaminação por metais e diversos outros compostos, é uso de biomarcadores de contaminação (LIMA, 2011).

1.2 Biomarcadores de contaminação aquática

Os biomarcadores de contaminação aquática são respostas biológicas que fogem da normalidade e que podem ser mensuráveis nos indivíduos que habitam áreas com suspeitas de contaminação, em decorrência da ação tóxica dos poluentes presentes no ambiente (WALKER et al., 1996). Estas ferramentas são aplicadas tanto em experimentos laboratoriais quanto em pesquisas de campo (VAN DER OOST et al., 2003), com o objetivo de diagnosticar áreas impactadas por poluentes (MONSERRATET et al.,2007).

De acordo com WHO (1993), biomarcadores podem ser subdivididos em três classes:

- ✓ Biomarcadores de exposição: podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou populações a uma substância exógena ou seus metabólitos, fornecendo uma relação entre a exposição externa e a dosagem interna do composto tóxico. Logo, com esses biomarcadores, é possível detectar o composto tóxico que está presente no organismo.
- ✓ Biomarcadores de efeito: são usados para detectar alterações bioquímicas, fisiológicas e outras alterações em tecidos ou fluídos corpóreos de um organismo que podem ser reconhecidas e associadas com algumas perturbações para a saúde ou surgimento de doenças.
- ✓ Biomarcadores de suscetibilidade: indicam a capacidade de diferentes organismos em responder à exposição a algum xenobiótico específico.

Dentre os biomarcadores de efeito estão, por exemplo, os biomarcadores enzimáticos, cujas alterações indicam os efeitos metabólicos dos poluentes ambientais, e os biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade, que são aqueles que evidenciamos efeitos mutagênicos no organismo (AMORIM, 2003).

1.2.1 Parâmetros genotóxicos

Testes que avaliam a genotoxicidade e toxicidade são de suma importância para a obtenção de informações a respeito do desequilíbrio genético causado nos organismos por um determinado poluente no ecossistema (MORAES et al., 2002). Testes genotóxicos podem ser feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* e têm como objetivo detectar a ação de compostos que induzem danos no material genético, tais como quebras na fita do DNA, mutações, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo (SILVA; SALVADORI, 2007).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras da molécula de DNA. Na grande maioria dos casos, a lesão é corrigida pelo sistema de reparo celular ou, se isso não acontecer, a célula é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provoca mutações, que podem ser transmitida para as células filhas durante o processo de replicação e, neste caso, o agente é considerado mutagênico (MÍDIO; MARTINS, 2000). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004).

Os recentes avanços na genética toxicológica resultaram em uma variedade de metodologias que podem ser usadas para avaliar o impacto de agentes potencialmente genotóxicos aos organismos (BICKHAM et al., 2000; JHA, 2004), servindo como um sinal de aviso de futuros problemas ambientais (SOUZA; FONTANETTI, 2010).

O teste do micronúcleo e o ensaio do cometa são utilizados, por muitos autores, como biomarcadores de efeitos para avaliar o efeito genotóxicos que os xenobióticos podem causar sobre os organismos aquáticos (SPEIT et al., 1999; CADET et al., 2010; VICARI et al., 2012).

1.2.1.1 Teste do micronúcleo

Uma técnica eficaz, barata e rápida para a avaliação genotoxicológica é o teste do micronúcleo (HEDDLE et al., 1983). Micronúcleos são observados em células em divisão, portadores de quebras cromossômicas e/ou perdas de cromossomos inteiros que não são devidamente segregados para os polos da célula. Durante a telófase, o envoltório nuclear se forma em volta desses cromossomos perdidos (fator aneugênico) ou dos fragmentos acêntricos (fator clastogênico), os quais assumem, gradualmente, a morfologia de um núcleo interfásico, mas de menor tamanho que o núcleo principal da célula, por isso denominado de “micronúcleo” (FENECH, 2000) (Fig. 1 A-C). Para Leme e Marin-Morales (2009),

micronúcleos maiores podem indicar um efeito aneugênico, resultando da perda cromossômica, enquanto micronúcleos pequenos podem indicar uma ação clastogênica resultante da quebra cromossômica. Os danos cromossômicos estruturais estão relacionados à exposição direta do agente mutagênico com o DNA ou com defeitos intracelulares na replicação do DNA, recombinação ou mecanismo de reparo (FENECH, 2000).

A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células (VILCHES, 2009). Os micronúcleos formados por agentes genotóxicos só aparecem após um ciclo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003). Portanto, a frequência de micronúcleo dentro da população celular é altamente dependente da cinética da proliferação de células, que por sua vez pode variar de espécie para espécie, de acordo com o tecido alvo e dependendo das condições ambientais (AL-SABIT; METACALFE, 1995). A grande limitação do uso de micronúcleos para a identificação de danos citogenéticos é que agentes ou substâncias que não quebram os cromossomos ou não causam a perda destes na anáfase não serão detectados, como, por exemplo, as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem a ocorrência de fragmento acêntrico (HEDDLE et al., 1983).

O teste do micronúcleo consiste na contagem de células que contém um ou mais micronúcleos em adição ao núcleo principal (VIARENGO et al, 2007). Hoofmam e Raat (1982) adaptaram o teste do micronúcleo, originalmente desenvolvido por Schmid (1975) em células da medula óssea de ratos, para aplicação em peixes. Por apresentarem cromossomos pequenos, em grande quantidade, e com baixo índice mitótico, a aplicação do teste de micronúcleo, na maioria das espécies de peixes, tornou-se extremamente vantajosa quando comparado a outros testes mutagênicos (KLIGERMAN, 1982), sendo usada com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006). Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para este teste, pois, sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente como resultado de atividade clastogênica dos contaminantes. Assim sendo, este teste pode ser considerado como um indicador bastante sensível da exposição crônica a contaminantes aquáticos (AL-SABTI; METCLAFE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Como um complemento do teste do micronúcleo, muitos autores examinam a ocorrência de alterações morfológicas no núcleo dos eritrócitos de peixes, como possíveis indicadores de genotoxicidade (AYLLON; GARCIA-VAZQUES, 2001). Essas anormalidades nucleares foram classificadas por Carrasco et al. (1990) como: células

binucleadas, *blebbed* (evaginações sutis do envoltório nuclear); *lobed* (evaginações proeminentes do envoltório nuclear); *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim), *broken-eggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por um pequeno filamento nucleoplasmático) e vacúolos (espaços no núcleo desprovidos de material genético). Essas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processos de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade, causadas por agentes químicos (CORMAK, 1991; NAKANO; OKA, 1991; FENECH, 2000) (Figura 1).

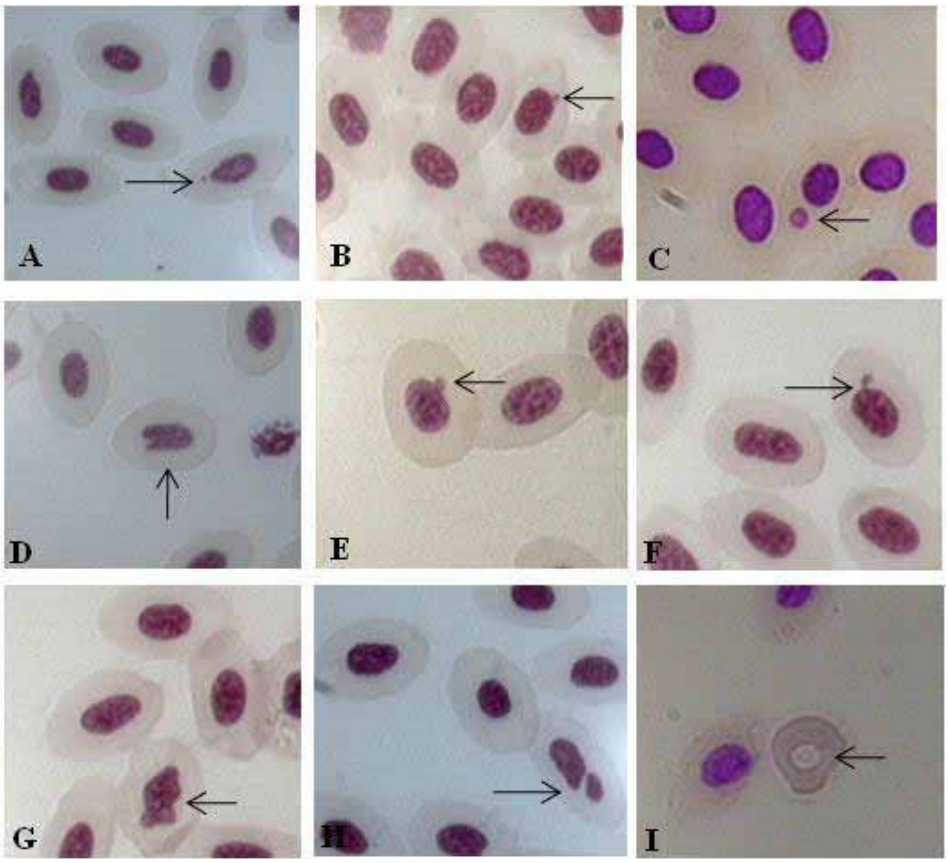


Figura 1: Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto. A-C. Células micronucleadas; D. Núcleo *notched* (seta); E. Núcleo *lobed* (seta); F. *Broken-eggs* (seta); G. Núcleo *blebbed* (seta); H. Célula binucleada (seta); I. Cariólise (seta) (MASCHIO, 2009).

Um grande número de compostos químicos pode interferir na síntese de DNA dos organismos expostos, resultando em anormalidades nucleares (SOUZA; FONTONETTI, 2006; BEUTLER, 1985). De acordo com Shimizu et al. (2001), a formação dessas anormalidades representam um caminho para eliminar qualquer material genético amplificado do núcleo da célula. Para Ghandially (1982), alterações nucleares do tipo *notched*, provavelmente, podem estar associadas com eventos de aneuploidias. Eiras (1990) identificou

anormalidades nucleares em peixes com deficiência de ácido fólico ou que tinham sido afetados pela necrose viral, assim como em espécimes expostos ao cloro e cádmio.

Embora os mecanismos responsáveis pelas anormalidades nucleares não sejam amplamente conhecidos, estas anormalidades são consideradas indicadores de genotoxicidade; portanto, elas complementam as contagens de micronúcleo nos estudos genotóxicos, o que dá uma maior sensibilidade para esta análise (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005).

1.2.1.2 Ensaio do cometa

Uma variedade de métodos de avaliação de genotoxicidade tem sido desenvolvida para a detecção de lesões no DNA, sendo uma das técnicas mais utilizadas na toxicologia aquática o ensaio do cometa, ou eletroforese de célula simples (SCGE) (SINGH et al., 1988). O ensaio do cometa é um método genotoxicológico sensível para avaliar danos do DNA em células simples, permitindo a detecção de quebras do DNA e de sítios álcali-lábeis (suscetíveis ao tratamento alcalino) (CHRISTOFOLETTI et al., 2009).

As vantagens deste ensaio, comparando com outros testes de genotoxicidade, incluem a relativa facilidade de aplicação para qualquer tecido de interesse, sensibilidade para detecção dos danos no DNA, necessidade de pequeno número de células (<10.000) (LEE; STEINERT, 2003), e curto período de tempo para a condução do experimento. De acordo com Padrangi et al (1995) e Lemos et al (2005), diferentes tecidos de organismos aquáticos podem ser usados para o ensaio cometa. Entretanto, em muitos casos, eritrócitos têm sido usados como célula-alvo, pois requerem pouco volume e podem ser obtidas por meio de técnica não prejudicial aos organismos (BELPAEME et al.,1998).

Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a proporem o ensaio cometa, para quantificar danos na molécula de DNA. O terno “cometa” é usado porque, em células com aumento de dano no DNA, é visível o aumento da migração do DNA cromossomal, após eletroforese em meio alcalino, do núcleo em direção ao ânodo, dando ao mesmo um aspecto que se assemelha a forma de um cometa (SPEIT; RHTFUSS, 2012) (Figura 2).

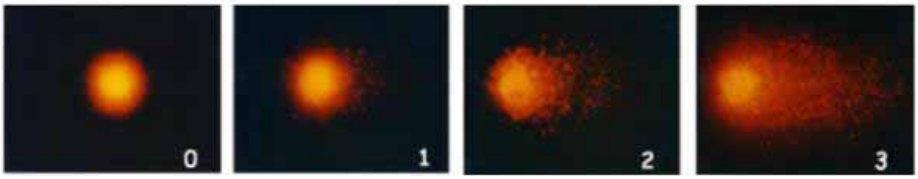


Figura 2 - Imagens do ensaio do cometa, mostrando uma célula sem dano (0); pouco dano (1); dano médio (2) e grande dano (3) (Kobayashi et al., 1995).

Nessa técnica uma suspensão de células isoladas é misturada com agarose em uma lâmina de microscopia, de modo que o DNA é imobilizado para realizar a eletroforese. As lâminas passam por uma lise com detergente e soluções salinas altamente concentradas, que remove o envoltório nuclear e a membrana celular, e extrai suas proteínas nucleares (incluindo as histonas), respectivamente, deixando o DNA relaxado. Logo após a lise, as células são submetidas a uma corrida de eletroforese sob condições básicas (pH>10). Os danos no DNA são visualizados por microscopia fluorescente depois da coloração com corante, normalmente brometo de etídeo, que se liga ao DNA. (COLLINS, 2004; BURLINSON, 2012).

Singh (1988) modificou a técnica proposta por Östling e Johanson, adotando o pH maior que 13 para realizar a eletroforese. O uso do pH alcalino fez com que as caudas do cometa ficassem mais pronunciadas, além de melhorar a visualização dos danos do DNA que podem ser detectados (COLLINS et al., 1997). Durante a última década, este ensaio tornou-se uma ferramenta muito utilizada por pesquisadores interessados em áreas de investigação desde biomonitoramento humano e ambiental a processos de reparo do DNA pela genotoxicologia (TICE et al.,2000).

1.2.2 Peroxidação lipídica

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas continuamente em células de organismos aeróbios, como parte dos processos fisiológicos, metabólicos e outras reações bioquímicas (VALAVANIDIS et al., 2009). Tais ERO incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$),o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção dessas ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, levando a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA et al., 2005) como DNA e lipídeos (VAN DER OOST et al., 2003).

O radical hidroxil (•OH), com meia vida de nanosegundos, é um radical livre com uma grande importância biológica e toxicológica, devido ao seu forte potencial oxidativo com componentes celulares tais como lipídeos de membranas biológicas e DNA (RICHTER, 1987; STADTMAN; LEVINE, 2000; JACKSON; LOEB, 2001).

A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, ou lipoperoxidação (LPO) é uma consequência importante do estresse oxidativo e tem sido extensivamente investigado (STEGEMAN et al., 1992). A abstração de um átomo de hidrogênio destes ácidos graxos por um radical pode levar a formação de um radical lipídico que, por sua vez, pode reagir com o

O_2, formando um radical peroxil. Este, por sua vez, pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo adjacente estabelecendo, assim, uma cadeia de reações autocatalíticas que leva à oxidação das biomembranas em hidroperóxidos lipídicos (ESTERBAUER, 1984).

Os produtos da peroxidação lipídica, apesar de serem menos reativos que os radicais livres que iniciaram a lipoperoxidação, podem ser potencialmente citotóxico, como é o caso do malondialdeído (MDA) (RODRIQUES, 2009), que tem sido usado como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003).

A LPO resulta em transtornos na permeabilidade celular, alteração do fluxo iônico, alteração da seletividade de nutrientes e, posteriormente, leva ao rompimento da membrana ou mesmo quebras em moléculas menores, como determinados aldeídos, que, por si só, já são tóxicos para a célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

De forma a contrapor os efeitos das ERO, os sistemas biológicos têm desenvolvido, durante a evolução mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, adequados para proteger seus componentes celulares contra danos oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006), que podem ser causados por diferentes agentes ambientais, tais como radiação UV, metais tóxicos, vários solventes orgânicos ou compostos químicos (AZQUETA et al., 2009). O desbalanço entre as defesas antioxidantes e a produção de ERO, onde ocorre um aumento nas lesões oxidativas, é conhecido como estresse oxidativo e, nessas situações, é possível observar aumentos nos níveis de produtos da LPO, como o MDA.

1.3 Toxicidade dos Metais

A contaminação do ambiente por metais vem aumentando a cada ano (MAJER et al., 2002), como consequência do aumento da urbanização, expansão da atividade industrial e exploração de recursos naturais (BINEY et al., 1994). Muitos metais desempenham um papel crucial na dinâmica dos organismos, sendo necessários para uma função fisiológica normal, quando estão em concentrações traço, como é o caso do cobre, ferro, zinco, manganês, cobalto, selênio e cromo (GILFORD, 1993). Ao contrário, existem outros que não são requeridos em nenhuma atividade metabólica e, por isso, são tóxicos para as células, mesmo em pequenas concentrações, como, por exemplo, Hg, Pb, Cd, Cr e Ni (BOWEN, 1979; CLARCK, 1997)

O chumbo (Pb) inorgânico é muito utilizado em vários processos industriais, como produção de explosivos, pesticidas e baterias (JOHNSON, 1998). A sua toxicidade é importante, devido à sua persistência no ambiente (GURER-ORHAN et al. 2004), podendo

ser responsáveis pela morte ou por mudanças na reprodução, crescimento e alterações comportamentais de peixes (BURDENA et al., 1998). Ramsdorf (2007), ao estudar o efeito de diferentes concentrações do Pb^{2+} em eritrócitos de *Hoplias malabaricus* (traíra), observou, por meio do ensaio do cometa, que o Pb^{2+} mesmo em baixas concentrações, causou uma diferença significante de danos nos nucleóides, entre o grupo controle e o grupo tratado.

O cádmio (Cd), por não ser um metal essencial, pode causar inúmeros efeitos tóxicos aos organismos. Esse metal afeta a progressão do ciclo celular, a diferenciação, a replicação do DNA e os mecanismos de reparo (DONG, et al., 2001; FANG et al., 2002; YANG, et al., 2004; OH; LIM, 2006). Joseph (2009), em sua revisão dos mecanismos carcinogênicos do cádmio, relata que vários genes têm sua expressão influenciada pela exposição a cádmio, como, por exemplo, o aumento da expressão dos genes responsáveis pela síntese de proteínas, como metalotioneínas, que combatem ao estresse induzido pela exposição ao cádmio.

Ayllon e Garcia–Vazquez (2001) avaliaram os efeitos genotóxicos do cádmio em *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna,* e observaram que, nas duas espécies de peixes expostas a várias concentrações de cádmio, houve um aumento significativo de anormalidades nucleares, mesmo que a formação dos micronúcleos não tivesse sido induzida. Estudos realizados por Almeida, et al. (2002), com tilápias do Nilo, expostas por 60 dias a diferentes concentrações ao cádmio, mostraram que radicais livres foram produzidos como mediador da toxicidade e do cádmio aos peixes. Mas a resistência desenvolvida pelos peixes que sobreviveram ao tratamento está relacionada com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, as quais são importantes para a proteção dos danos causados pelo cádmio, o que diminuiu a formação de lipoperóxidos nas biomembranas.

O ferro (Fe) é um elemento essencial necessário para o crescimento e sobrevivência de quase todos os organismos (VALKO et al., 2005), estando envolvido em diversos processos metabólicos como o transporte de oxigênio, o transporte de elétrons, a síntese de DNA e atua como cofator de muitas proteínas (SALVADOR et al., 2011). Porém, em altas concentrações, o Fe pode aumentar a formação de radicais livres (reação de Fenton) e se tornar extremamente tóxico para a célula (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005), causando oxidação na molécula de DNA, peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas (VALKO et al., 2005).

O cobre (Cu) é um dos metais de transição mais abundantes na natureza e um componente essencial para todos os seres vivos (PELGROM et al., 1995). O cobre serve como um cofator para diversas proteínas, estando envolvido no mecanismo de uma série de reações biológicas, tais como a fotossíntese e a respiração, formação do tecido conjuntivo, metabolismo do ferro

e funções neurológicas (KUO et al., 1999). Porém, quando em excesso, o Cu passa de elemento essencial a elemento tóxico para a célula (PEDROZO; LIMA, 2001). Almeida et al. (2004), ao avaliar o sistema de defesa antioxidante e o nível de peroxidação lipídica em glândulas digestivas de mexilhão (*Perna perna*), após exposição ao cobre em concentrações ambientalmente relevantes (40µg/L) por 12, 24, 72 e 120 horas, por exemplo, observaram que, com 120 h de exposição, o cobre aumentou o nível peroxidação lipídica e diminuiu o nível da enzima glutationa peroxidase específica para hidroperóxidos de fosfolipídeos (PHGPx), indicando um papel protetor da (PHGPx) contra a peroxidação lipídica.

1.4 Substância húmica aquática

A matéria orgânica natural presente nos corpos aquáticos está envolvida, em grande parte dos processos ambientais, sendo a maior parte dela constituída por substâncias húmicas aquáticas (SHA) (MARTINS, 2013). As SHA são constituídas de uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais e da atividade de síntese de microorganismos (ROCHA; ROSA, 2003). Após as transformações microbiológicas, formam uma estrutura quimicamente complexa, composta por um grupo de compostos heterogêneos, escuras, hidrofílicas e ácidas (SCHNITZER, 1982).

Devido à natureza heterogênea e complexa das SHA, pouco se sabe sobre sua estrutura química, que se apresentam como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas com elevada massa molar (AIKEN et al., 1985; SENESI; MIANO, 1994). Os grupos que compõem as SHA apresentam uma estrutura complexa formada de anéis aromáticos e grupos funcionais reativos como ácidos carboxílicos, cetonas, grupos fenólicos, aminas, amidas, entre outros que, devido à alta composição de oxigênio e nitrogênio, apresentam uma alta capacidade de complexação com metais (ROMÃO et al., 2002). Nas reações de redução, o estado de oxidação dos metais é alterado, modificando a toxicidade, mobilidade e biodisponibilidade dessas espécies (ROCHA et al., 1997).

Desta forma, diversos estudos têm demostrado que as SHA possuem alta capacidade de complexação a diversas espécies metálicas, diminuindo a biodisponibilidade e toxicidade dos metais aos organismos (LEVERSEE et al., 1983; DE PAOLIS; KUKKONEN, 1997; HIROSE, 2007). Estudos realizados por Santos et al. (2008), mostraram que, em ambientes onde há presença de maior quantidade de matéria orgânica dissolvida, ocorre redução da biodisponibilidade do cobre, bem como da toxicidade do metal para zooplânctons. As SH

possuem uma característica redox dependente das condições do meio, elas podem reduzir espécies como Cr (VI) a Cr (III) alterando a toxicidade dessas espécies, uma vez que a espécie hexavalente é bem mais tóxica que a trivalente (ROMÃO et al., 2002).

Por outro lado, Sánchez-Marín et al. (2007) observaram que, em invertebrados marinhos (*Mytilus edulis* e *Paracentrotus lividus*), a concentração do chumbo aumentou na presença de SHA. A explicação para esse fato foi que a matéria orgânica dissolvida modifica a voltagem celular, induzindo a abertura dos canais celulares, como o de cálcio, e acredita-se que a absorção do chumbo segue um caminho semelhante ao cálcio, o que facilitou a entrada do chumbo na célula dos organismos, aumentando a toxicidade dos mesmos, mesmo na presença de SHA.

1.5 Peixes como organismo teste

A avaliação de biomarcadores de poluição é comumente utilizada como técnica de monitoramento ambiental, uma vez que acrescenta informações a respeito da resposta biológica que aquele determinado ambiente apresenta na presença desses poluentes (WHO, 1996). Os peixes têm sido comumente usados como organismos teste para avaliação de biomarcadores em ecossistemas aquáticos, porque eles realizam um papel importante na cadeia alimentar, podendo bioacumular substâncias tóxicas diretamente ou indiretamente, através da ingestão de compostos dissolvidos na água e de organismos previamente contaminados, e apresentando respostas fisiológicas mensuráveis, as quais podem indicar os efeitos dos contaminantes no ambiente (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005).

De acordo com Harshbarger e Clark (1990), peixes são bons organismos-teste para monitorar a qualidade da água, pois podem ser mantidos em laboratório e serem facilmente expostos aos contaminantes, permitindo avaliar a presença de substâncias que tenham potencial para causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos. Além disso, os peixes podem acumular grandes quantidades de metais em seus tecidos, já que algumas espécies são geralmente consideradas o topo da cadeia alimentar aquática (MANSOUR; SIDKY, 2002).

A espécie *Oreochromis niloticus* (Linneaus,1758), conhecida como tilápia do Nilo, é utilizada, por muitos autores, como bioindicador para avaliar a contaminação ambiental causada pela emissão de compostos químicos no ambiente aquático (ÇAVAS; ERGENE-GOZURAKA, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTONETTI, 2006; VENTURA et al. , 2008). Entre as espécies de peixes cultivadas no mundo, é a que melhor

resiste à alta temperatura, à baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água (BOSCOLO et al., 2001; El-SAYED, 1999).

1.6 Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

No Brasil existem leis que regulamentam limites para as concentrações em que os compostos podem estar presentes na água. Um delas é a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), em que as águas doce, salobra e salina do território nacional são divididas em classes, conforme a qualidade requerida para seus principais usos, como abastecimento de água, proteção de comunidades aquáticas e recreação. As águas doces são classificadas em: classe especial, classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4.

Águas de classe 3 podem ser destinadas:

a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;

b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;

c) à pesca amadora;

d) à recreação de contato secundário;

e) à dessedentação de animais.

De acordo com cada classe de água, são estabelecidos valores máximos de concentração para vários compostos orgânicos e inorgânicos (LANGIANO, 2006). Para águas de classe 3, as concentrações permitidas de Cd, Pb, Cu e Fe é de 0 ,01mg/L, 0,033mg/L, 0,013mg/L e 5,0mg/ L, respectivamente.

Os contaminantes, raramente, ocorrem de forma isolada no ambiente, estando os organismos aquáticos, de um modo geral, expostos a misturas complexas de poluentes. Assim, predizer o impacto de misturas de compostos químicos, com base no conhecimento dos efeitos individuais de cada composto, pode não refletir o que realmente se passa no organismo, tornando-se, pois, indispensável o conhecimento prático das respectivas interações (MASCHIO, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sabendo-se do potencial tóxico de metais para os peixes, e que as substâncias húmicas aquáticas têm potencial de se complexar aos metais, tornando-os menos biodisponíveis, este trabalho teve por objetivo principal avaliar a influência da presença das SH, no meio aquático, em concentrações ambientalmente relevantes, no efeito genotóxicos e bioquímico dos metais Cu, Fe, Pb e Cd, isolados ou em mistura, e em concentrações limite estabelecidas para águas de Classe 3, conforme a legislação 357/2005 do CONAMA.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial mutagênico, por meio do teste do micronúcleo e das anormalidades nucleares, de os metais isolados (Fe, Cd, Pb e Cu) e em mistura, na ausência e na presença de SHA, podem gerar no DNA de eritrócitos de *O. niloticus.*
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico, por meio do ensaio do cometa, que os metais isolados (Fe, Cd, Pb e Cu) e em mistura, na ausência e na presença de SHA, podem gerar no DNA de eritrócitos de *O. niloticus.*
- ✓ Avaliar o nível de estresse oxidativo, por meio da análise do nível de MDA, que os metais isolados (Fe, Cd, Pb e Cu) e em mistura, na ausência e na presença de SHA, podem gerar no DNA em brânquias de *O. niloticus.*

3. JUSTIFICATIVAS E CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A PROPOSTA DO TRABALHO

Uma vez colocada a contextualização e os objetivos do presente trabalho, é importante salientar que o mesmo se trata de um desdobramento de um projeto maior desenvolvido por nosso grupo sob co-orientação do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e em conjunto com o grupo da Profa. Dra. Márcia Cristina Bisinoti, ambos do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE, UNESP. Nesse projeto maior, o objetivo geral está em concordância com o apresentando no presente trabalho, ou seja, estudar até que ponto a presença de SHA no ambiente aquático pode reduzir os efeitos deletérios de metais em peixes, visto que possuem a capacidade de complexar aos metais, diminuindo sua biodisponibilidade para os animais. Para tanto, o trabalho iniciou-se pelo grupo da Profa. Dra. Márcia, que coletou amostras de água na Represa Municipal de São José do Rio Preto e purificou e caracterizou as

SHA quanto à capacidade de complexação aos metais (Fe, Cu, Cd e Pb), observando que a presença das mesmas em água reduz a biodisponibilidade dos metais (Tabelas I e II constante no ítem “Anexos”, no final do trabalho). Posteriormente, foram realizados experimentos de exposição dos peixes por sete dias aos diferentes metais, na presença e ausência das SHA, para avaliação dos efeitos dos metais nos peixes e para validar se, na presença das SHA, haveria de fato alguma diminuição do efeito. Nosso grupo então participou na segunda etapa, realizando e avaliando a indução de metalotioneínas nas brânquias dos peixes, as quais foram realizadas por outra aluna de mestrado, e avaliação dos níveis de lesões em DNA pelos testes do cometa e avaliação de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos, bem como avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas brânquias. Quanto aos níveis de metalotioneínas, que são proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteínas com alta capacidade de quelação de metais e que são altamente induzidas por estes em peixes, observamos que houve significativa diminuição da indução da produção de metalotioneína nos animais expostos aos metais na presença de SHA da Represa Municipal de São José do Rio Preto (Figura I dos “Anexos”), ressaltando o efeito protetor das SHA contra os efeitos dos metais nos peixes. Com relação aos efeitos nas lesões em DNA e lipídeos, são os dados que ora se apresentam nesse trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Os organismos-teste usados para a realização da pesquisa foram peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), conhecidas como tilápias do Nilo (Figura 3). Os espécimes foram obtidos junto à piscicultura da UNESP (Campus de São José do Rio Preto/SP), levados para o laboratório de experimentos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA), aclimatados por uma semana em temperatura média de 26°C, para posteriormente serem usados nos experimentos.

Foram realizados três experimentos, sendo que, para o experimento sem SHA, foram utilizados 30 espécimes, enquanto que para os experimentos com SHA, por ter um grupo controle com SHA, foram utilizados 35 espécimes, com cerca de 12 cm de comprimento, para evitar diferenças relacionadas ao tamanho e idade dos peixes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo nº 043/2011.

Figura 3 - Espécie de peixe *Oreochromis niloticus*

4.2 Exposição laboratorial a misturas de metais e a metais isolados

Para cada experimento (peixes expostos aos contaminantes nas concentrações limites para águas de Classe 3, Quadro 1), foram utilizados 30 aquários de plástico para o experimento sem SHA (Figura 4-A) e 35 para cada um dos experimentos com SHA (Figura 4-B), com capacidade de 20 litros, sendo que cada aquário recebeu apenas um peixe. Cada grupo experimental foi composto de cinco aquários (N=5). No primeiro experimento (Figura 4-A) foi avaliado o efeito dos metais na ausência da SHA. Um dos grupos foi destinado ao controle, contendo apenas água limpa, enquanto que os demais grupos receberam tratamento com os metais Fe, Cd, Pb e Cu, isoladamente, um outro grupo continha a mistura de todos os metais nas mesmas concentrações. O segundo e o terceiro experimento (Figura 4-B) foram idênticos ao primeiro, exceto pelo fato de que as exposições aos metais, isolados e em mistura, foram feitas na presença de 1,5 mg/L e 5 mg/L de SHA extraída e caracterizada do Rio Preto. Um grupo controle contendo SHA foi também usado para fins comparativos. Os peixes permaneceram por 7 dias expostos aos tratamentos e, após esse período, os mesmos foram anestesiados com fenoxietanol (2 ml/L) e o sangue foi retirado para as análises do teste do micronúcleo e do ensaio do cometas. Nenhum alimento foi fornecido aos peixes durante o experimento.

Quadro 1: Limites individuais para cada contaminante da Classe 3, estabelecido pela Resolução 357 do CONAMA

Limites individuais para cada substância para a Classe 3 (Resolução 357/2005do CONAMA)	**Contaminantes ambientais**			
	Cádmio	**Chumbo**	**Cobre**	**Ferro**
	0,01mg/ L	0,033mg/ L	0,013mg/ L	5,0mg/ L

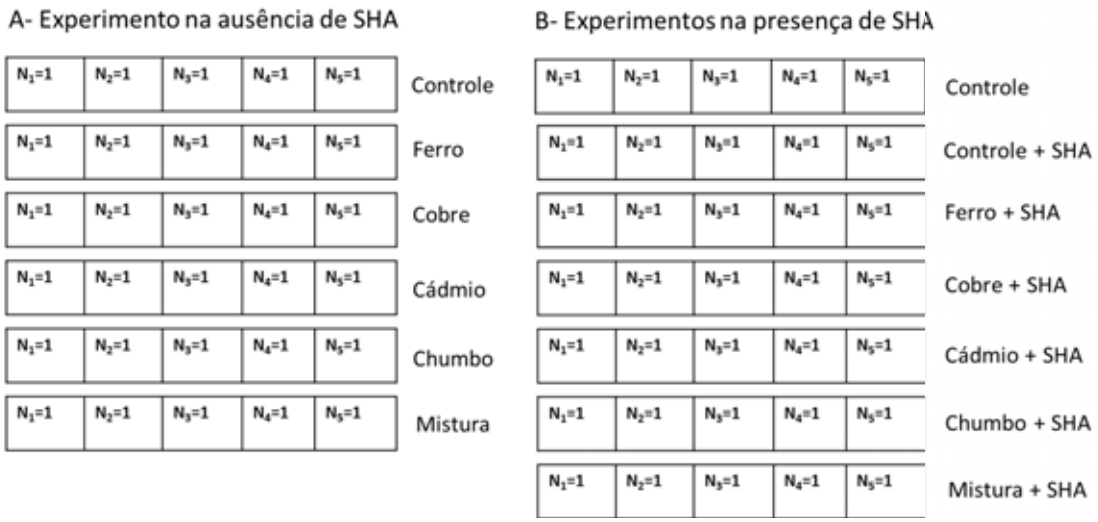


Figura 4 – Delineamento experimental do experimento sem SHA (A), com 30 aquários, com um peixe por aquário, e dos experimentos com SHA (B), com 35 aquários cada experimento, também com um peixe por aquário.

A quantificação dos metais nos aquários com e sem SHA, bem como medidas de parâmetros físico-químicos e físicos foram feitas pelo grupo da Profa. Dra. Márcia Bisinoti, e os dados encontram-se nas tabelas I a IV dos “Anexos”.

4.3 Extração e caracterização de Substância Húmica Aquática do rio Preto

A extração da SHA foi realizada nas amostras de águas do Rio Preto (S20º48’40.94”O49º21’13.62”), pelo procedimento recomendado pela *International Humic Substances Society* (IHSS). Enquanto que a caracterização foi feita seguindo o método descrito por TANDI (2013), empregando técnicas de espectrometria ultravioleta visível e fluorescência molecular. A SHA, caracterizada a partir das amostras da água do Rio Preto, possuem na sua estrutura grupamentos aromáticos, carboxílicos, carbonílicos, ácidos graxos de metil ésteres, derivados de polissacarídeos, biopolímeros alifáticos derivados de plantas, hidrocarbonetos de cadeia longa e ramificada com grupos metilenos e carbono alquilas e uma maior presença de ácido húmico na sua estrutura (MARTINS, 2013).

Esses dois procedimentos foram realizados no Laboratório de Estudos de Ciências Ambientais, coordenado pela Profª Drª Márcia Cristina Bisinoti, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do campus de São José do Rio Preto (UNESP).

4.4 Descarte dos resíduos gerados e da água contaminada

Após a realização dos experimentos, a água utilizada para a exposição dos animais foi filtrada, utilizando-se uma bomba de sucção acoplada a filtro de carvão ativado e lâmpada UV para que os resíduos tóxicos ficassem retidos e os microorganismos presentes fossem mortos. Assim a água pôde ser descartada normalmente, sem causar prejuízo ao meio ambiente.

Todos os resíduos tóxicos produzidos para a realização do experimento e posteriormente à realização deste foram devidamente identificados e armazenados em recipientes específicos para que fossem encaminhados para o entreposto de resíduos químicos da UNESP, do campus de São José do Rio Preto.

4.5 Teste do micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo (MN), foi realizada uma punção cardíaca, com seringa heparinizada, para a retirada de cerca de 3cc de sangue de cada espécime. Para o preparo das lâminas, a primeira gota de sangue da seringa foi descartada, com o intuito de evitar a contaminação do sangue com o líquido corporal e muco.

Duas lâminas foram confeccionadas, pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas), para cada indivíduo. O material foi fixado, por 10 minutos, em metanol absoluto e, após 24 horas, foi submetido à reação de Feulgen, que compreende duas etapas: uma hidrolise ácida em HCl 1M a 60º C, durante 11 minutos e, posteriormente, a submissão ao reativo de *Schiff*, por 2 horas, em local escuro.

Um total de 3.000 eritrócitos (1500 por lâmina), selecionados aleatoriamente, foram analisados para cada peixe do estudo, sob objetiva de imersão (100x). A média e o desvio padrão do número de eritrócitos com micronúcleo e outras alterações nucleares foram determinadas pela análise de 15.000 células por grupo. As alterações nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco et al. (1990), como descritas anteriormente. No gráfico (figura 1 e figura 2) os valores estão representados pela média e desvio padrão.

4.6 Ensaio do cometa

O mesmo sangue coletado para o teste do micronúcleo foi utilizado para o ensaio do cometa. Para tanto, 10 µL de sangue foi diluída em 1.000 µL de solução fisiológica. As lâminas foram preparadas com 10 µL de suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37ºC. As lâminas permaneceram em uma suspensão de lise (1mL de

triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM, para 1L) em geladeira por uma hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese. Para as corridas foram adicionadas solução alcalina (NaOH 300mMe EDTA 1mM, pH ~13), por 20 min a 25 V, 300 mA. As lâminas foram, a seguir, neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos. A coloração foi realizada com brometo de etídeo (0,02mg/ml) e as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss, filtro B-34 (excitação: λ = 420 – 490nM, barreira: λ = 520 nM), em objetiva de 100x.

Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides (50 por lâmina) selecionados aleatoriamente. O software *Comet Imager* 2.2 (MetaSystems) foi utilizado para medir o comprimento da cauda, porcentagem de DNA degradado (% de DNA na cauda, Figura 5).

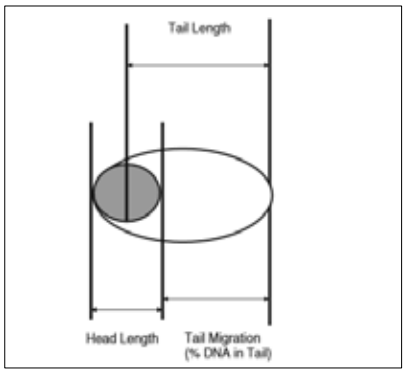


Figura 5 – Esquema de um cometa demostrando as medidas que foram utilizadas para as análises das imagens. *Tail legth*: comprimento da cauda; *Tail migration*: % de DNA na cauda do cometa (Burlinson B., 2012).

4.6.1 Dificuldades encontradas com a técnica do ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado nos três experimentos, mas, devido a problemas metodológicos com a técnica, não foi possível analisar as lâminas obtidas dos experimentos com SHA. Os cometas não apresentaram o formato exigido pela técnica para se obter resultados confiáveis na hora das análises. A partir deste problema, tentamos uma modificação do protocolo, testando diferentes variáveis como: mudança na voltagem e na amperagem da corrida de eletroforese, tempo da corrida de eletroforese e até mesmo mudança da fonte, da cuba de eletroforese e dos reagentes utilizados, mas nenhum destes testes fez com que os cometas ficassem no formato desejado. Por fim, um último teste foi realizado com as condições exigidas pelo protocolo sem modificações e em algumas lâminas obtivemos resultados satisfatórios para os cometas.

Portanto, repetimos os dois experimentos com SHA e foram feitas quatro lâminas por peixe, para garantir as análises. Mas, ao analisarmos as lâminas, tivemos novamente o problema com o formato dos cometas. Devido à falta de tempo, não pudemos fazer os experimentos pela terceira vez. Por esses motivos, apenas os resultados do experimento sem SHA serão apresentados neste trabalho.

4.7 Peroxidação lipídica

Para a avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em tecidos da brânquia, foi detectada a presença de níveis do produto formado ente MDA e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), via cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector UV (HPLC/UV) em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003, 2004).

As análises foram realizadas a partir da homogeneização de 100mg de tecido em 300 µL de tampão Tris–HCl 100 mM, pH 8,0. Após a homogeneização, 300 µL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2M foram adicionados em cada amostra, que em seguida, passaram por um processo de incubação por 40 minutos a 90° C. Posteriormente, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol após centrifugação a 3500 rpm por 3 minutos. As amostras (20 µL) de MDA-TBA foram injetadas no HPLC acoplado a um detector UV e monitoradas a 532 nm, como descrito acima.

A fase móvel era uma solução de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 50mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada (1 $ml.min^{-1}$). A coluna utilizada foi LC-18 (150 x 4,6 mm, 5µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de padrões autênticos de MDA derivatizado com o TBA. Os dados foram expressos em pmol MDA/mg tecido.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos *softwares Statistica* 7.1(Statsoft) e Biostat 5.0. Foi aplicado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (Levene). Para os dados paramétricos foi aplicado Anova *One-Way* seguido do teste de *Fisher*. Para os dados não paramétricos foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis*. Antes de aplicar o teste de normalidade, foi considerado outlier(s) o(s) valor(es) que se encontrou numa distância de 2,5 de escores da média, para $n < 50$. Diferenças significativas foram aceitas somente para $p < 0,05$. Como a variância amostral dos grupos do experimento sem SHA é heterogênea, optamos em não excluir outlier (s), de forma que o N não ficasse < 3.

6. RESULTADOS

6.1. Micronúcleos

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que não ocorreu diferença estatisticamente significante para a formação de micronúcleos tanto para o experimento na ausência de SHA quanto para os experimentos na presença de SHA (Figura 7), em eritrócitos de *O. niloticus.*

6.2. Anormalidades nucleares

Em relação ao somatório das anormalidades nucleares, obtivemos um aumento estatisticamente significante em relação ao controle para o experimento na ausência da SHA, ocorrendo para os animais expostos ao chumbo e à mistura de metais (Figura 7A). Uma diminuição estatisticamente significante ocorreu para o cádmio, em relação ao controle sem SHA e também para animais expostos ao chumbo e ao cádmio, em relação ao controle com SHA no experimento na presença de 1,5 mg/L de SHA (Figura 7B). Já no experimento onde os animais foram expostos aos metais na presença de 5mg/L de SHA, não houve diferenças significantes para nenhum dos grupos (Figura 7C).

As anormalidades nucleares, quando analisadas individualmente, nos permitiram constatar um aumento estatisticamente significante para alterações do tipo *notched* (Tabela 1 e Figura 6A), entre animais do grupo controle expostos à mistura dos metais no experimento na ausência de SHA (Tabela 1) e uma diminuição estatisticamente significante entre animais expostos ao cádmio em relação ao controle sem SHA (Tabela 2) e expostos ao chumbo e ao cádmio em relação ao controle com SHA para o experimento na presença de 1,5 mg/L de SHA (Tabela 2).

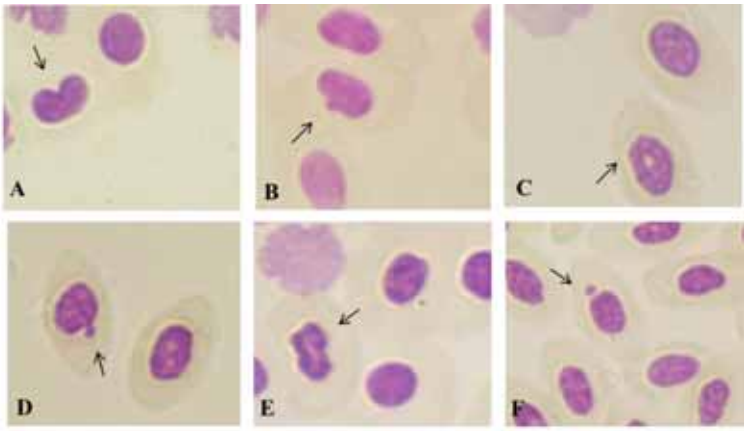
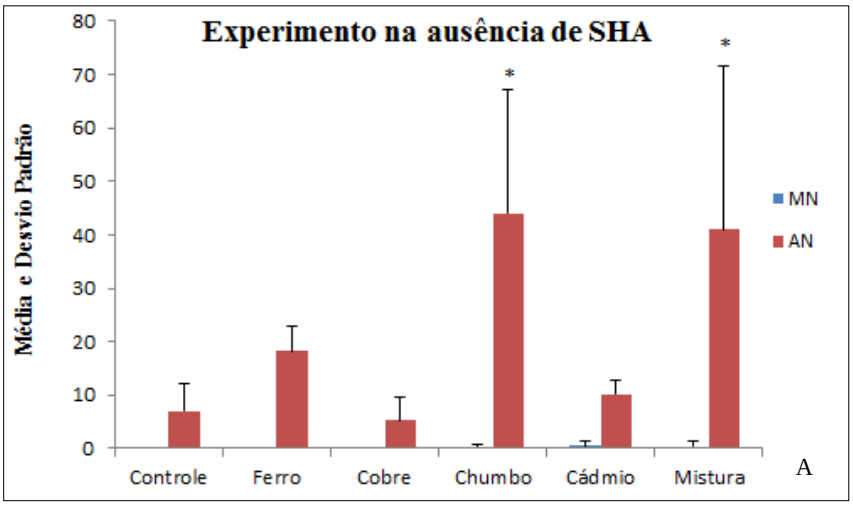
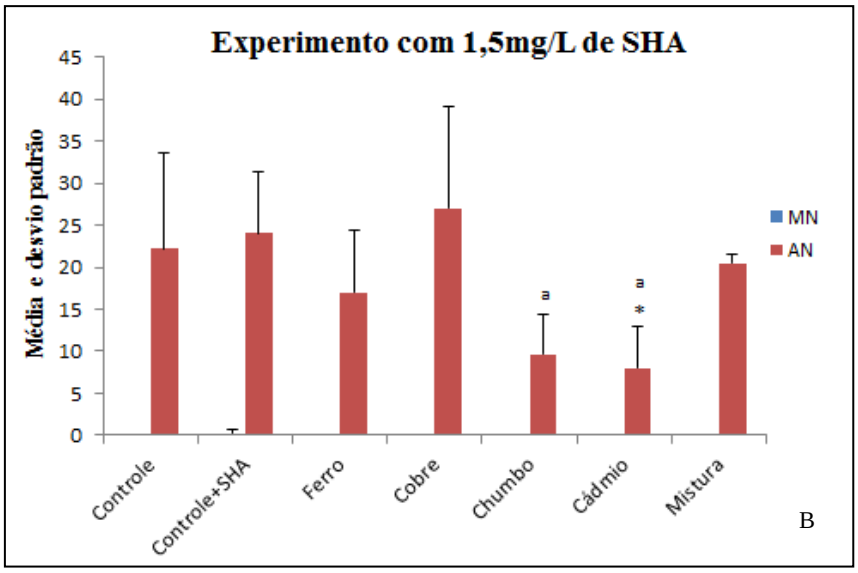


Figura 6: Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a 1,5 mg/L de SHA.A-Núcleo *notched* (seta);; B-Núcleo *lobed* (seta); C- Núcleo com vacúolo (seta); D- Núcleo *broken-eggs*(seta); E- Núcleo *Blebbed*; F- Micronúcleo.





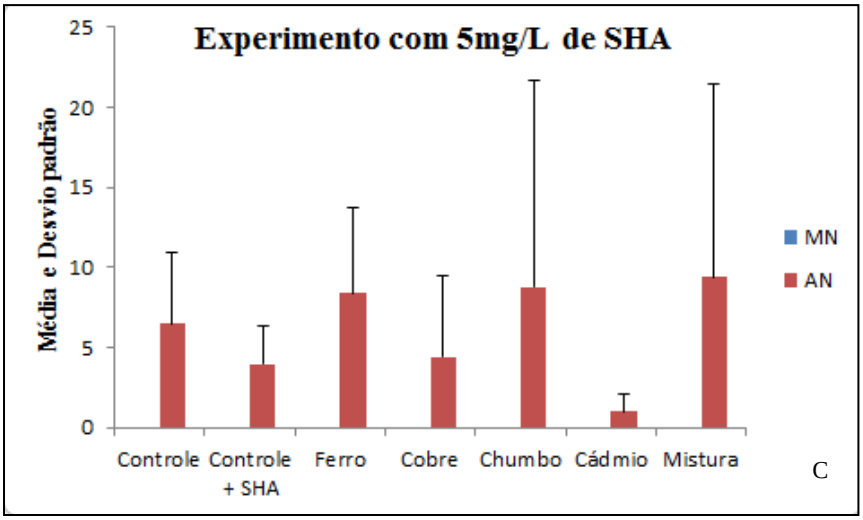


Figura 7- Médias e desvio padrão de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares, encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência ou na presença de 1,5 e 5 mg/L de SHA. * valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle e [a] significante em relação ao controle com SHA, pelo teste Kruskal-Wallis.

Tabela 1: Incidência de anormalidades nucleares (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência de substância húmica.

Alterações	Controle	Ferro	Cobre	Chumbo	Cádmio	Mistura
BN	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,44	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
V	0,25 ± 0,5	1,2 ± 0,83	1 ± 1,41	11 ± 16,23	0,4 ± 0,54	1,8 ± 2,04
NT	6,66 ± 5,5	15 ±2,7	3,33 ±4,04	26,75±11,64	4,66±2,3	34±23,79 *
LB	0,33 ±0,57	1,8±1,3	1,25±1,25	2,2±1,78	4,2±3,7	4,4±5,68
BL	0,5 ± 1	0,8 ± 0,83	0,25 ± 0,5	0,2 ± ,44	0,6 ± 1,34	0,2 ± 0,44
BE	0,5 ± 1	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,5	0,4 ± 0,54	0,6 ± 0,89	0,6 ± 1,34
MT	7±5,29	18,25±4,64	5,25±4,42	44±23,30 *	10,25±2,62	41±30,68 *
TA	21	73	21	176	41	205
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000

Tabela 2: Incidência de anormalidades nucleares (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na presença de 1,5 mg/L de substância húmica aquática

Alterações	Controle	Controle+SHA	Ferro	Cobre	Chumbo	Cádmio	Mistura
B	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
V	1,8 ± 4,02	1,2 ±2,68	0,2 ± 0,44	0,4 ± 0,89	0,8± 1,3	0,25 ±0,5	0,0 ± 0,00
NT	14,4±9,47	19,2±6,97	11,8±6,68	13,4±12,64	8±3,39 [a]	6,25±3,2 [*a]	14±6,62
LB	2,4±1,14	3±3,31	2,4±1,76	3,4±3,13	0,4±0,54	1,5±2,38	2±1,87
BL	0,2 ± 0,44	0,0 ± 0,00	0,2±0,44	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,54
BE	0,2 ± 0,44	0,6 ± 0,89	0,2 ± 0,44	0,6 ± 0,89	0,4 ± 0,89	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,44
MT	19±12,2	24±7,31	14,8±8,07	17,8±15,3	9,6±4,82	8±4,89	16,8±8,31
TA	95	120	74	89	48	28	84
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000

Tabela 3: Incidência de anormalidades (media ± DP) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na presença de 5 mg/L de substância húmica aquática

Alterações	Controle	Controle+SHA	Ferro	Cobre	Chumbo	Cádmio	Mistura
BN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,6 ±3,57	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,44	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
V	0,25 ± 0,5	0,8 ± 1,30	4,2 ± 3,19	1 ± 2,23	7 ± 10,34	1 ± 1,41	6,8 ± 9,73
NT	6,66±5,5	3,5±2,38	1,75±1,25	3,4±3,50	1,4±2,19	3,8±7,42	1,8±3,03
LB	0,33±0,57	0,4±0,89	0,2±0,44	0,00±0,00	0,2±0,44	0,2±0,44	0,4±0,89
BL	0,5 ± 1	0,0 ± 0,00	1±1,41	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,4 ± 0,89
BE	0,5 ± 1	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,4 ± 0,89
MT	6,5±4,43	4±2,34	8,4±5,31	4,4±5,12	8,8±12,85	1±1,15	9,4±12,11
TA	26	20	42	22	44	4	47
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000

BN: binucleada; V: vacúolo; LB: núcleo *lobed*; NT: núcleo *notched;* BL: núcleo *blebbed;* BE: *broken-eggs;* MT: média total; TA: total de células analisadas com alteração; NCA: número total de células analisadas. * diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) em relação ao controle sem SHA [a] diferença estatisticamente significante em relação ao controle com SHA , pelo teste Kruskal-Wallis

6.3. Ensaio do cometa

O ensaio cometa, realizado nos peixes expostos aos metais na ausência de SHA, mostrou que não houve diferença entre os tratamentos para os comprimentos das caudas dos cometas dos eritrócitos dos peixes (Figura 8), porém houve diminuição estatisticamente significante na porcentagem de DNA presente na cauda do cometa para os animais expostos ao chumbo, cádmio e à mistura dos metais em relação ao controle (Figura 9).

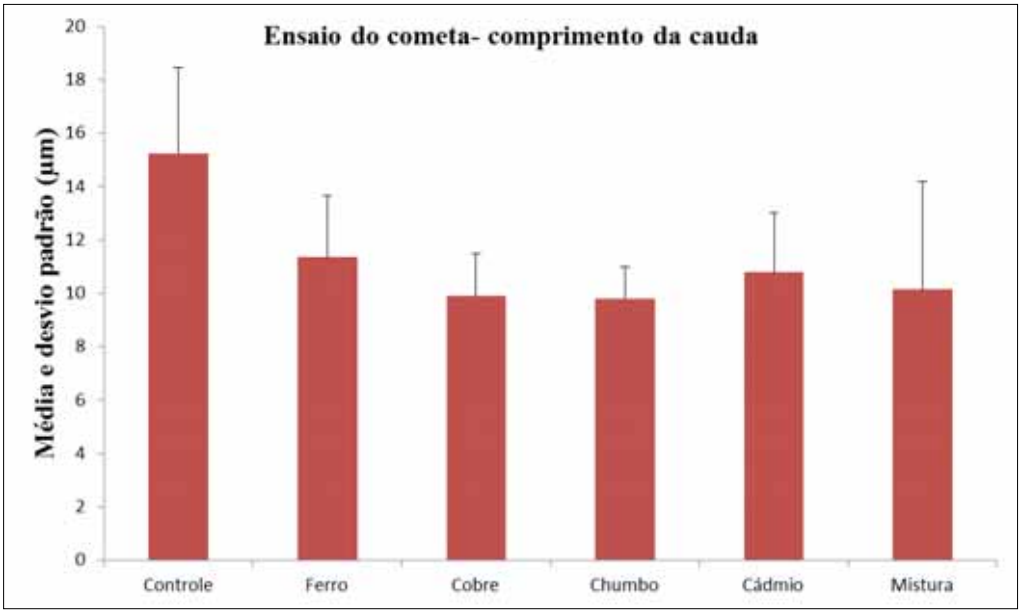


Figura 8- Médias e desvio padrão do comprimento da cauda(µm) dos cometas encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA.

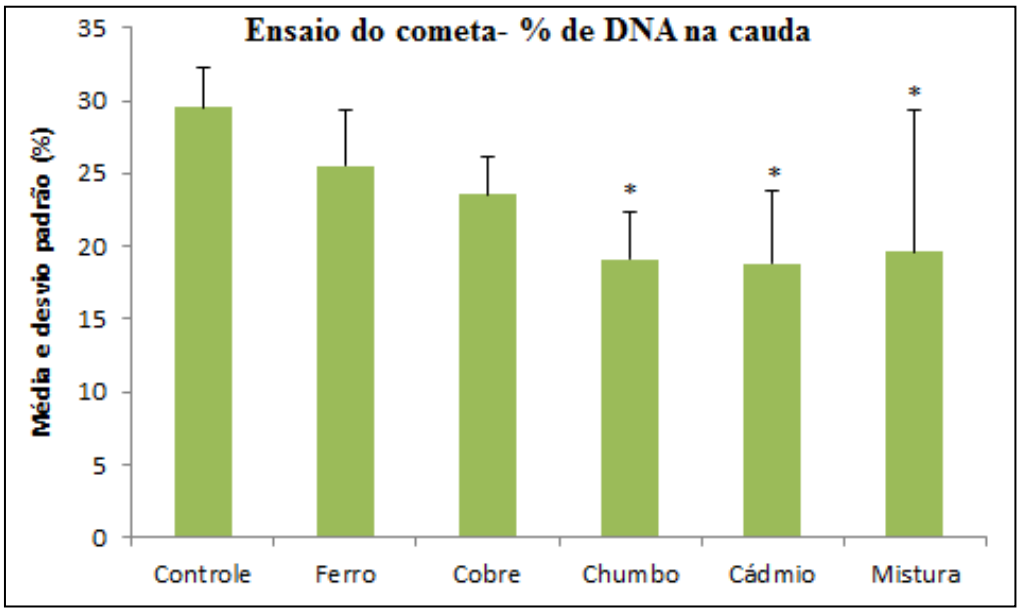


Figura 9- Médias e desvio padrão do comprimento da% de DNA na cauda dos cometas encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA. * significante ($p < 0,05$) em relação ao controle, pelo teste Kruskal-Wallis.

6.4. Avaliação da peroxidação lipídica

Ao analisarmos a concentração de MDA nas brânquias dos peixes dos diferentes tratamentos na ausência de SHA, observamos um aumento estatisticamente significante para os animais expostos ao Pb, ao Cd e à mistura de metais em relação ao grupo controle. Quando os animais foram expostos aos mesmos tratamentos na presença de SHA, foi observado aumento significativo nos níveis de MDA apenas nas brânquias do grupo exposto à mistura dos metais para o experimento com 1,5 mg/L de SHA, e dos grupos expostos ao Cd e à mistura dos metais para o experimento usando 5 mg/L de SHA (Figura 10).

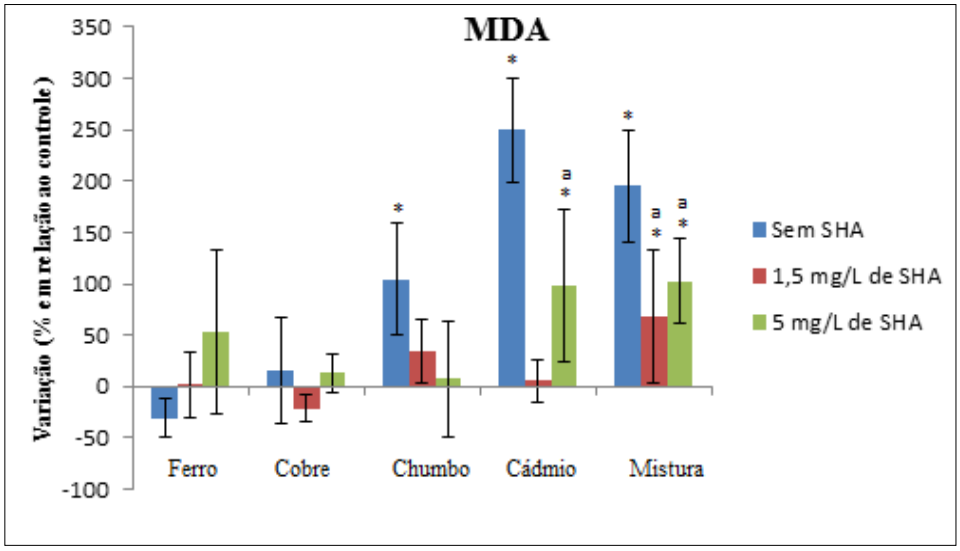


Figura 10-Valores de MDA expressos em porcentagem em relação ao controle encontrados em brânquias de *Oreochromis niloticus*, após 7 dias de exposição a metais na ausência SHA, na presença de 1,5 mg/L de SHA e 5mg/L de SHA

7. DISCUSSÃO

O ambiente aquático é, frequentemente, o destino final de uma grande quantidade de contaminantes gerados pela atividade antrópica (JHA, 2004). Dependendo da concentração dos mesmos no ambiente, muitos desses compostos químicos, apesar de não serem letais, podem levar a significativas alterações fisiológicas, celulares e moleculares que levam a importantes prejuízos em longo prazo (VENTURA, 2008).

No nosso estudo, os valores inalterados das frequências de micronúcleos nos animais expostos aos metais nos permitem inferir que as concentrações recomendadas pelo CONAMA para águas de Classe 3, na ausência e na presença de SHA, e de acordo com as condições experimentais usadas, não apresentaram efeitos mutagênicos nos peixes, mas são genotóxicas,

uma vez que houve aumento das anormalidades nucleares para o experimento na ausência de SHA . Sabe-se que um grande número de substâncias químicas, incluindo metais, pode causar danos diretos ao DNA ou interferir na síntese, levando ao aparecimento destas anormalidades nucleares (SOUZA; FONTONETTI, 2006; VENTURA et al, 2008) e que a indução de micronúcleos em eritrócitos de peixes por compostos químicos depende da sua concentração (MANNA et al., 1985; BUCKER et al., 2006) e do tempo de exposição dos organismos às substâncias testadas (DAS; NANDA, 1986). Deve-se ressaltar que, em nosso estudo, os animais foram expostos por sete dias aos metais que foram adicionados aos aquários apenas no primeiro dia. Dessa forma, deve-se levar em conta que, após 7 dias de exposição, os animais puderam ativar mecanismos de defesa e reparo contra as lesões em DNA, assim como puderam metabolizar os metais a substâncias menos tóxicas ou ainda bioacumular os metais em seus tecidos, tornando-os menos biodisponíveis aos organismos para exercerem seus efeitos genotóxicos ao longo do tempo de exposição. Essa hipótese é, em parte, suportada pelos efeitos observados dos metais nos níveis dos cometas, onde foi notada uma diminuição significativa da porcentagem de DNA na cauda dos cometas nos animais tratados com Pb, Cd e mistura de metais. Ainda que não houve diferença estatística entre o controle e tratados para o comprimento da cauda, é notável que os valores médios desse parâmetro para os tratamentos foi sempre menor em comparação ao grupo controle, dado que, em conjunto com a diminuição na porcentagem de DNA na cauda observada, pode sugerir de fato uma ativação dos sistemas de reparo e/ou defesa contra lesões no DNA após 7 dias.

É interessante salientar que, em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, onde tilápias foram expostas por apenas três dias aos mesmos tratamentos, houve significativo aumento tanto nos micronúcleos quanto nos *scores* de cometa (MASCHIO, 2011), indicando que, a curto prazo, os metais nas concentrações testadas foram genotóxicos e mutagênicos. No presente trabalho, por não terem apresentado aumentos nos dados de micronúcleo, os metais, nas mesmas concentrações, não foram mutagênicos, e inclusive causaram diminuição na porcentagem de DNA na cauda do cometa, suportando a idéia de que os tratamentos, em exposição curta, podem induzir aumentos nas lesões em DNA, porém, após períodos mais longos de exposição, há um aumento nos níveis de defesa celular contra as lesões e/ou aumento na atividade dos sistemas de reparo das lesões, fazendo com que essas voltem a níveis basais.

É relatado por DANADEVI et al. (2000), porém em estudos com mamíferos, uma série de dados condizentes com esses resultados, onde se observam aumentos significativos nos níveis de lesões em DNA após exposição curta a metais, porém, após 7 ou 14 dias de exposição, as

lesões voltam a níveis basais. Leucócitos de ratos expostos em diferentes concentrações de nitrato de chumbo por um período de 24, 48, 72 h, 7 e 14 dias mostraram, por meio do ensaio do cometa, que, a partir de 7 dias de tratamento, houve uma diminuição do comprimento da cauda do cometa para todas as doses, indicando que também ocorreu reparo dos danos causados no DNA. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo mostrou que leucócitos de ratos expostos em nove concentrações diferentes de cloreto de cádmio, por 24h, 48h e 96h, apresentam uma diminuição gradual no comprimento da cauda do cometa depois de 48 horas de tratamento, o que levou a conclusão de que a diminuição dos danos de DNA acontece quanto menor for a concentração de $CdCl_2$ e maior for o tempo de exposição (DANADEVI et al., 2001). Banu et al. (2001), também analisaram, por meio do ensaio do cometa, amostras de leucócitos de rato expostas a diferentes concentrações de trióxido de arsênio pelo mesmo período de tempo (24, 48, 72 h, 7e 14 dias de exposição) e observaram que todas as doses causaram um aumento estatisticamente significante nos danos do DNA, com 48 h de tratamento. Por outro lado, ocorreu uma diminuição nos danos do DNA para todas as doses, após 72 h de tratamento, indicando que dependendo do tempo de tratamento vários atributos, como enzimas antioxidantes e enzimas de reparo de DNA, podem atuar na célula protegendo-a e reparando os danos causados no DNA por este metal.

Como comentado no item 3 (Justificativa), em paralelo ao presente estudo, foram analisados, por outra aluna de mestrado, os níveis de metalotioneínas nos peixes dos mesmos experimentos. As metalotioneínas possuem alta capacidade de complexar diversos metais, especialmente o Cd, Cu, Hg, Pb e Zn, indisponibilizando-os nos tecidos e fluídos corpóreos, promovendo assim proteção contra seus efeitos deletérios. Nesse estudo, realizado em paralelo, notou-se que as metalotioneínas aumentaram de concentração nas brânquias dos peixes, após 3, 7 e 14 dias de exposição, porém os maiores aumentos foram observados após 7 dias de exposição (Figura II, no item “Anexos"). Estes dados indicam que os metais, nas concentrações testadas, foram capazes de induzir a resposta protetora das metalotioneínas nos peixes, porém essa foi uma resposta tempo-dependente, ou seja, o aumento foi progressivo ao longo do tempo, o que poderia estar relacionado com os níveis nas lesões em DNA observados. Assim sugere-se também que, além de uma possível ativação dos sistemas de reparo de DNA ao longo do tratamento, com o aumento dos níveis de metalotioneínas, após 7 dias, menos metal ficou disponível para causar lesões ao DNA.

Por outro lado, ainda que não tenha havido diferenças nos níveis de micronúcleos entre controle e tratados, foi observado que o Pb e a mistura de metais na ausência de SHA aumentaram os níveis de anormalidades nucleares, quando comparados ao grupo controle,

sugerindo que, apesar do aumento nas defesas celulares, como, por exemplo, os níveis de metalotioneínas e dos sistemas de reparo, como verificado por outros autores, os metais ainda exerceram efeitos negativos nos peixes após 7 dias, sugerindo um resquício, ainda, dos efeitos prévios dos metais. Na presença das SHA, foi observada uma diminuição para os níveis de anormalidades nucleares, indício do papel protetor adicional das SHA contra os efeitos negativos dos metais.

Por fim, os dados de MDA também se mostraram de acordo com o papel protetor das SHA contra os efeitos negativos dos metais. Ainda que tanto na ausência quanto na presença de 1,5 ou 5,0 mg/L de SHA a mistura dos metais foi capaz de aumentar os níveis de MDA, assim como o Cd na presença de 5,0 mg/L de SHA, da mesma forma como no grupo controle, foi notado que a adição de SHA suprimiu o aumento do MDA nos animais tratados com Pb, para as duas concentrações de SHA testadas, e com Cd para os animais tratados com 1,5 mg/L de SHA. Essa diminuição, quando ocorreu, poderia indicar um decréscimo na produção de ERO mediada pelos metais, em função do decréscimo em sua biodisponibilidade.

A presença de metais como o cromo, ferro, cobre, cádmio, chumbo e zinco em ecossistemas aquáticos são uma grande preocupação ambiental, devido à toxicidade e genotoxicidade destes elementos sob as diversas formas de vida (FLOREA; BUSSELBERG, 2006). Além disso, interações imprevisíveis de misturas ambientais podem levar a diversas vias bioquímicas e, consequentemente, exercem resposta toxicológica diferente em organismos aquáticos. Esses efeitos são condicionados pelo modo de ação da mistura dos contaminantes (GROTEN et al., 2001; PRATO; BINDOLINO, 2007). Portanto, é de suma importância o biomonitoramento ambiental nos ecossistemas aquáticos, para definir parâmetros adequados para descarte de efluentes industriais e agrícolas, tratamentos de resíduos e esgoto que contenham esses contaminantes, como auxiliar na tomada de decisões para criação e modificação de leis que visam a proteger e a conservar os ambientes aquáticos.

Como demonstra esse estudo, os metais, mesmo em concentrações recomendadas pelo CONAMA para águas de classe 3, embora não tenham apresentado efeito mutagênico nos peixes e tenham causado uma diminuição dos danos ao DNA, analisados pelo ensaio do cometa, demostraram um potencial genotóxicos, com o aumento das AN e geração de estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica.

A diminuição das anormalidades nucleares e dos níveis de MDA na presença de SHA nos experimentos nos mostrou não só a importância de se avaliar o impacto que a interação dos metais tóxicos traz para a biota aquática, mas também o papel importante da matéria

orgânica presente na água, de forma a minimizar os efeitos dos metais nos peixes. Alguns autores já mostraram que metais como cobre, zinco, cádmio, mercúrio, cromo, chumbo, níquel, arsênico, estanho e o alumínio tendem a se complexar com substâncias orgânicas e inorgânicas presentes na água, reduzindo a sua biodisponibilidade no ambiente aquático (HEATH, 1995). Resultado relevante nesse trabalho foi constatar o efeito protetor contra os prejuízos causados aos peixes, para uma SHA coletada de local onde a água é usada para abastecimento público, ou seja, a Represa Municipal de São José do Rio Preto, indicando que sua presença naquele ambiente efetivamente pode diminuir os efeitos tóxicos dos metais que porventura existam no local.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Os metais, em concentrações recomendadas pelo CONAMA para águas de classe 3, tanto isolados quanto em mistura, na ausência quanto na presença de SHA não causaram efeitos mutagênicos em espécies de *O. niloticus* após 7 dias de exposição.
- ✓ As tilápias expostas aos metais podem ter ativado os sistemas de reparo e/ou defesa contra lesões de DNA após 7 dias de exposição, levando a uma diminuição dos danos em relação ao grupo controle. Por outro lado, nas condições experimentais testadas os metais podem causar efeitos genotóxicos aos peixes, devido um aumento de anormalidades nucleares observado no experimento na ausência de SHA.
- ✓ Nos experimentos realizados, as SHA se complexaram com os metais diminuindo as anormalidades nucleares e os níveis de peroxidação lipídica encontrados nos peixes, confirmando a sua capacidade de complexação com espécies metálicas, reduzindo os efeitos tóxicos causados pelos mesmos.
- ✓ A partir dos dados resultantes deste trabalho, sugerimos que as SHA, devido sua capacidade de complexação com os metais, podem ser utilizadas em projetos ambientais que visam a proteger ambientes aquáticos contaminados por diversas fontes de poluição.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AIKEN, G. R.; MCKNIGHT, M. D.; WERSHAW, R. L.; MACCARTHY, P.In Humic substances in soil, sediment and water. *Geochemistry, isolation and characterization;* New York, p.363-385, 1985.

AI-SABTI K., METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutation Research,* v. 343, p.121-135, 1995.

ALMEIDA J.A., DINIZB Y.S., MARQUESA S.F.G., FAINEB L.A., RIBASC B.O., R.C. BURNEIKOB, NOVELLIB E.L.B., The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, v.27, p.673–679, 2002.

ALMEIDA, E. A et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 318, p. 21–30, 2005.

ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology & Pharmacology*, v. 135, p. 295–303, 2003.

ALMEIDA, E.A., MIYAMOTO S., BAINY A. C.D., MEDEIROS M.H.G., DI MASCHIO, P., Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipidic peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to diferent metals, *Marine Pollution Bulletin*, v.49, p.386-392, 2004.

AL-SABTI K.; FRANKO M.; ANDRIJANIC B.; KNEZ S.; STEGNAR P. Chromium-induced micronuclei in fish, *Journal of Applied Toxicology*, v. 13, p 333–336, 1994.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epideiologia*, v.6, 2003.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.49 p.221–225, 2001.

AZQUETA A.; SHAPOSHNIKOV S.Collins A. R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay, *Mutation Research* , v. 674, p. 101–108, 2009.

BANU B. S., K. DANADEVI B.C., KAISER JAMIL B, AHUJA Y.R. , VISWESWARA RAO K. E, ISHAQ M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology* v.162, p.171–177, 2001.

BELPAEME K, COOREMAN K., KIRSCH-VOLDERS M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flat fish. *Mutation Resarch*, v.415, p.167-184, 1998.

BEUTLER E., Chemical toxicity of the erythrocyte, in: Toxicology of the Blood and Bone Marrow, *Raven Press*, p.182, 1985.

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBER, P.D.N; CHIKHI, L; ANTHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversty in natural populations: implications for biomonitorins and ecotoxicology. *Mutation Research*, v. 463, p. 33-51, 2000.

BINEY, C.; AMUZU, A.T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I.L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P.B.O.; OSIBANJO, O.; RADEGONDE, V. E SAAD, M.A.H. Review of

heavy metals in the african aquatic environment. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.28, p.134-159, 1994.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FURUYA, W.M.; MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p. 1391-1396, 2001.

BOWEN, J.J.M. Environmental chemistry of the elements, *London Academic Press*. p.333, 1979.

BURDENA, V. M., SANDHEINRICH, M. B., & CALDWELL, C. A. Effects of lead on the growth and 6-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile e rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Environmental Pollution*, v.101, p.285–289, 1998.

BURLINSON, B. The in vitro and in vivo comet assays. *Genetic Toxicology: Principles and Methods*, Methods in Molecular Biology, v. 817, p.143-163, 2012.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L; Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 9–21, 2010.

CAJARAVILLE, M. P., The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environmental*, v. 247, p. 295-311, 2000.

CARRASCO .R., TILBURY L., MAYERS M.S., Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminats effects, Journal of Fisheries and Aquatic Science, v.47, p.2123-2136,.1990.

ÇAVAS T., S. ERGENE-GÖZÜRAKA, Induction of micronuclei and nuclear abnoramities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 264–271, 2005.

CHRISTOFOLETTI C. A., DAVID, J. A. O.; FONTANETTI C. S;APPLICATION of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 155-158, 2009.

CLARCK, H. Marine Pollution. Clarendon Press. Oxford, 1997.

CLAXTON L.D.; HOUK V. S.; HUGLES T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluens, *Mutation Research* , v. 410, p. 237-243, 1998.

COLLINS A. R., The Comet Assay for DNA Damage and Repair, *Molecular biotechnology*, v.26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. R., DOBSON, V. L., DU¸SINSKÁ, M., KENNEDY, G., AND ŠTETINA, R., The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Resarch*, v. 375, v. 183–193, 1997.

CORMAK, D.H. (Ed.), *Hams Histologia*, Guanabara Koogan, p. 5-35, 1991.

DANADEVI, K., SALEHABANU B., MAHBOOB M., KAISER JAMIL, PARAMJIT GROVER; In Vivo Genotoxic Effect of Cadmium Chloride in Mice Leukocytes Using Comet Assay Teratogenesis, *Carcinogenesis, and Mutagenesis*, v.21, p.325–333, 2001.

DAS, R.K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutatuion Resarch,* v.175, p. 67 - 71,1986.

DONG S., SHEN H.M., ONG C.N., Cadmium-induced apoptosis and phenotypic changes in mouse thymocytes, *Molecular and Celular Biochemistry,* v.222 p.11–20, 2001.

EIRAS JC Observations on erythrocytes abnormalities in fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, v.10, p.64-67, 1990.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture,* v.179, p.149–168, 1999.

ESTERBAUER, H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: POLI, G. et al. (Eds) *Free Radicals in Liver Injury*. Oxford: IRL Press, 1984.

FANG M.Z., MAR W., CHO M.H., Cadmium affects genes involved in growth regulation during two-stage transformation of Balb/3T3 cells, *Toxicology* ,v.177, p.253–265, 2002.

FENECH M., The in vitro micronucleus technique, *Mutation Resarch* v.455, p. 81–95, 2000.

FLOREA A.M.; BUSSELBERG D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds, *Biometals,* v.19, p. 419-427, 2006.

GHANDIALLY F.N., Ultrastructural pathology of the cell and matrix, *Butter worths,* p. 971, 1982.

GILFORD, J. Environmental toxicology and risk assessment. LANDIS et al. (Ed). STP 1179.*Astm Internacional* p. 7-21, 1993.

GRISOLIA; C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research,* v.491, p.39-41, 2001.

GROTEN J.P., FERON M.J.; SUHNEL, J., Toxicology of simple and complexe mixtures, *Trend Pharmacology* Sci, v.22, p.316-322, 2001.

GROVER; In Vivo Genotoxic Effect of Cadmium Chloride in Mice Leukocytes Using Comet Assay Teratogenesis, *Carcinogenesis, and Mutagenesis*, v.21,p.325–333, 2001.

GURER-ORHAN H., U SABIR H., OZGÜNEŞ H., Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology,* v.195, p.147-54. 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3° ed. UK: *Oxford University Press,* p. 936, 2000.

HARSHBARGER, M.A; J.B. CLARK Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America, Sci. *Total Environmental,* 94, 1-32, 1990.

HEATH, A.G., Water pollution and fish physiology, *Lewis publishers,* 1995.

HEDDLE, J.A., M. HITE, B. KIRKHART, K. MAVOURIN, J.T. MAC- GREGOR, G.W. NEWELL AND M.F. SALAMON () The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, *Mutation Research*, v.123, p. 61-118, 1983.

HIROSE K., Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM; *Applied Geochemistry*, v. 22, p.1636-1645, 2007.

HOFFMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) en the peripheral blood erythocytes of the eastern mudminnow *Umbra pigmaea* by ethilmethanesulphonate.*Mutation Resarch, v.* 104, p. 147-152, 1982.

HOSE, J.R.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. *Marine Environmental Research*, v.22, n.3, p.167-176, 1987.

JACKSON, A.L., LOEB L.A., The contribuition of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in câncer. *Mutation Resarch.* v.477, p.7-21, 2001.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, *Mutation Research*, v. 552, n. 1-2, p. 1–17, 2004.

JOHNSON, F.M. The genetic effects of environmental lead, *Mutation Research,* v.410, p.123-140, 1998.

JOSEPH P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis, Review *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 238, p. 272–279, 2009.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE J. A., *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology***,** Academic Press, p.435-456, 1982.

KOBAYASHI H., SUGIYAMA C., MORIKAMA Y., HAYASHI M., SOFUNI T.. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis, MMS Comm, v.3, p. 103-115, 1995.

KUO, Y.M.; ZHOU, B.; COSCO, D.; GITSCHIER, J. Copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.*98*, p. 6836-6541, 2001.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, v. 544, p. 43-64, 2003.

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

LEMOS N.G., DIAS A.L., SILVA-SOUZA A.T., MANTOVANI M.S., Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology Pharmacology* 19:197-201, 2005.

LEVERSEE, G. J.; LANDRUM, P. F.; GIESY, J. P.; FANNIN, T. Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.40, p.63-69, 1983.

LIMA, M. C.; GIACOMELLI, M. B. O.; SÜPP, V.; ROBERGE, F. D.; BARRERA, P. B; Especiação de cobre e chumbo em sedimento do rio tubarão (sc) pelo método tessier, *Quimica Nova*, v.24, p.734-742, 2001.

LIVINGSTONE D.R., Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, *Bulletin of Marine Pollutants*, v.42, p. 656–666, 1998.

LYONS, B.P.; HARVEY, J.S.; PARRY,J.M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost Lipophryspholis. *Mutation Research*, v.390, p.263-268, 1997.

MAJER BJ, TSCHERKO D., PASCHKE A., WENNRICH R, KUNDI M, KANDELER E., KNASMÜLLER S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: A comparative investigation. *Mutattion Resarch*, v. 515, p. 111-124, 2002.

MALTBY, L.; NAYLOR, C. Premilinary observations on the ecological relevance of the Gammarus“ scope for growth” assay: effect of zinc on reproduction. *Functional Ecology*, v.4, p. 393-397, 1990.

MANNA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleus Test in The Peripheral Erythrocytes of The Exotic Fish, *Oreochromis mossambica*. *The Nucleus*, v.28 n. 3, p.176-179, 1985.

MANSOUR, S.A.; SINDY, M.M Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Govemorate, *Egypt. Food Chemistry*, v. 78, p.15-22, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In*: A bacia do rio Tibagi*, cap.29, p. 551-557, 2002.

MARTINS, F.C. O papel das substâncias húmicas na disponibilidade de metais e benzo[a]pireno e indução de metalotioneínas em peixes (Mestrado em Química), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2013.

MASCHIO, L. R. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto – SP / Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2009.

MASCHIO. L. R. Avaliação de biomarcadores bioquímicos e genéticos em tilápias expostas a contaminantes ambientais (Relatório de Pós doutorado), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2011.

MATSUMOTO S.T., M.S. MANTOVANI, MALAGUTTI M.I.A., DIAS A.L, FONSECA I.C , MARIN-MORALES M.A., Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.148–158, 2006.

MATSUMOTO, S. T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.18, n. 1, p.77-85, 2005.

MÍDIO, A.; MARTINS, D. I. Toxicologia de alimentos. São Paulo:Varela, p.295, 2000.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J., BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiologypart C: Toxicology and Pharmacology*, v.146, p.221-34, 2007.

MORAES, D.S.L.; JORDAO, B. Q. Degradacoes de recursos hidricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, v.36, p.370-4, 2002.

NAKANO, T.M.D.; OKA, K.M.D. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy, *Cancer*, v. 68, p. 517-523, 1991.

OH S.H., LIM S.C., A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells an this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation, *Toxicology and Appied Pharmacology*, v.212, p.212–223, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 123, p. 291-298, 1984.

PADRANGI R., PETRAS M., RALPH S., VRZOC M.Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp, *Environmental Molecular Mutagenic* , v. 26, p.345-356, 1995.

PEDROZO, I.V. LIMA, Ecotoxicologia do cobre e seus compostos, Série de Cadernos de Referência Ambiental v. 4, p.128, 2001.

PELGROM, S., LAMERS, L., LOCK, R., BALM, P., WENDELAAR BONGA, S., Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, Orechromismossambicus, to sublethal copper exposure. *Environmental Pollution,* v. 90, p.415–423, 1995.

POWERS, D.A. Fish as model systems, *Science*, v. 246, p.352-358, 1989.

PRATO E., BINDOLINO F. Combined toxicology of Mercury, copper and cadmium on embriogenesis and erlylarval states of *Mytillus galloprovincialis, Environmental Technology* v. 28, p.915-920, 2007.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de astyanax (astyanaxsp b e a. altiparanae) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda cangüiri – ufpr). Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2007.

RASHED, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environmental Int.* v. 27, n. 1, p. 27-33. 2001.

RICHTER, C. Biophysical consequences og lipid peroxidation in membranes. *Chemical and Physics of Lipids*, v.44, p.175-189, 1987.

ROCHA J.C., TOSCANO I.A., BURBA P., Lability of heavy metal species in aquatic humic substances characterized by ion exchange with cellulose phosphate, *Talanta,* v.44, p.69-74, 1997.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; Substâncias Húmicas Aquáticas: interações com espécies metálicas. São Paulo: Ed. UNESP, 2003.

RODRIGUES A. C. F. "Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (Oreochromis niloticus) e cascudo (Pterygoplichthys anisitsi), como biomarcadores de contaminação ambiental. Dissertação (Mestrado em Biologia animal), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2009.

ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, A. B.; ROCHA, J. C.;ROSA, A. H. Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica, Eclética Química, v. 27, p.383-391, 2002.

SAJWAN K. S., SENTHILKUMAR, K, PARAMASIVAM, S., COMPTON, S.S., RICHARDSON, J.P., Elemental status in sediment and American oyster collected from Savannah marsh/estuarine ecosystem. An preliminary assessment *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* v. 54, p.245-258, 2008.

SALVADOR, G. A.; ROMINAN, M. U.; GIUSTO, N. M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's Disease,* 2011.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: *Mutagênese Ambiental,* Canoas: Ulbra, p.201-224, 2003.

SANCHEZ-MARÍN, P.; LORENZO, J. I.; BLUST, R.; BEIRAS, R. Humic Acids Increase Dissolved Lead Bioavailability for Marine Invertebrates. *Environmental Science and Technology*, 41, p. 5579-5684, 2007.

SANTOS M. A. P. F., MELÃO, M. G. G., LOMBARD A. T., The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera), *Ecotoxicology*, v.17, p. 449–454, 2008.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Priciples and Methods for Their Detection (Hollanender, A., ed.). New York: Plenum Press, v. 4, p. 31-53, 1976.

SCHNITZER, M. Organic matter characterization. In: PAGE, A.L. (Ed.). Methods of soil analysis.2.ed. Madison: ASA/SSSA, v.2, p581-594,1982.

SENESI, N.; MIANO, T. M.; HUMIC substances in the global environment and applications on human health, *Elsevier;* Amsterdam, p 1368, 1994.

SILVA G., CAMARGO E., SALVADORI D., RIBEIRO D.. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. Oral Surgery, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; v. 104 p. 58-61, 2007.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., , SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Resarch*, v.175, p.184–191. 1988.

SOUZA T.S., FONTANETTI C.S. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus*(Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery J. *Braz. Soc. Ecotoxicology*., v. 7, p.17- 22, 2010.

SOUZA T.S., C.S. FONTANETTI, Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent, *Mutation Resarch*, v.605, p. 87–93, 2006.

SPEIT G. AND ROTHFUSS A.The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Testfor the Detection of DNA Damage and Repair, DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 920, p.79-89, 2012.

SPEIT G., TRENZ K., SCHUTZ P., ROTHFUß, MERK O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay, *Toxicology Letters*, v.110, p. 73–78, 1999.

STADTMAN E.R., LEVINE, R.L. Protein oxidation.Ann. NY Acad.Sci. v. 899, p.191-208, 2000.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER,M.; RICHARD, T.D.G.; FÖRLIN, L.; FOWLER,B.A.; SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A.. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: Biochemical,

Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress. *Lewis Publishers*, p. 235-335, 1992.

TADINI, A. Substâncias Húmicas Aquáticas: Caracterização e Interação com íons Crômio e Proposta de um Indicador de Matéria Orgânica Lábil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE/UNESP, 2013.

TICE R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental Molecular Mutagenesis,* v.35, p.206-221, 2000.

TONISSI, F.B.; Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, em brânquias, fígado e rim de *Oreochromisniloticus;* Tese apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental, 2009.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology Environmental Safety,* v. 64, p. 178-189, 2006.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8- OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. Journal of Environmental Science and Health Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, v. 27, p. 120–39, 2009.

VALKO M., MORRIS H., CRONIN M.T.D Metals, Toxicity and Oxidative Stress , *Current Medicinal Chemistry,* v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessement: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in Oreochromis niloticus (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* v.90, p.42-51, 2008.

VIARENGO A. , LOWE D., BOLOGNESI C., FABBRI E., KOEHLER A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology,* v. 146, p. 281–300, 2007.

VICARI T.; FERRARO, M.V.M.; MELA M.; RIBEIRO, C.A.O. ; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of methyl mercury(CH3Hgþ) in *Hoplias malabaricus. Ecotoxicology and Environmental Safety,* v. 82 p. 47–55, 2012.

VILCHES M., Análise genotóxica do rio cadeia/rs através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Feeval, Novo Hamburgo, 2009.

WALKER, C.H. et al. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis Ltd, 1996.

WHITE P. A.; RASMUSSEN The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Resarch* , v. 410, p.223- 236, 1998.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, 1993.

YANG P.M., CHIU S.J., LIN K.A., LIN L.Y., Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells, *Chemical Biology Interaction*, v.149, p.125–136, 2004.

ANEXOS

Tabela I. Valores obtidos na quantificação dos metais nos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição pelo grupo da Profa. Dra. Márcia Cristina Bisinoti.

Resolução Conama 357/05	CLASSE 3	
	I	F
Cu	**13 µg L^{-1}**	
Controle	2,2±0,1	1,9±0,4
Cobre	11,0±2,0	10,0±3,0
Mistura*	12,0±2,6	8,1±1,7
Cd	**10 µg L^{-1}**	
Controle	< 0,03	< 0,03
Cádmio	14,5±5,0	12,0±1,0
Mistura*	16,5±0,3	11,0±0,5
Pb	**33 µg L^{-1}**	
Controle	1,9±0,3	3,7±0,3
Chumbo	35,1±0,4	23,0±8,0
Mistura*	39,9±1,3	24,7±1,1
Fe	**5,0 mg L^{-1}**	
Controle	<0,01	<0,01
Ferro	5,4±0,4	4,0±0,5
Mistura*	3,3±1,4	3,8±0,2

*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

Tabela II. Valores obtidos na quantificação dos metais nos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição na presença de SHA, pelo grupo da Profa. Dra.. Márcia Cristina Bisinoti.

Resolução	0,5 mg L^{-1} SHA		1,5 mg L^{-1} SHA		5,0 mg L^{-1} SHA	
Conama 357/05	i	F	I	F	I	F
Cu			**13 µg L^{-1}**			
Controle	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	4,2±3,2	3,1±1,3
Controle SH	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	3,4±0,5	2,7±0,9
Cobre	10,1±0,4	5,5±1,5	10,4±0,7	4,8±0,8	13,6±1,4	3,5±1,2
Mistura*	9,5±0,8	1,9±0,7	9,3±0,3	4,1±0,5	13,1±0,3	3,1±0,7
SUFT	-	5,2±0,8	-	-	-	7,3±0,7
Cd			**10 µg L^{-1}**			
Controle	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0	0,7±0,1	0,7±0,0
Controle SH	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,1	0,1±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
Cádmio	11,3±0,1	7,2±1,2	9,3±0,3	4,0±0,7	14,2±0,3	7,2±1,3
Mistura*	12,1±0,2	1,9±0,2	9,0±0,6	2,1±0,4	12,5±0,2	2,3±0,3
SUFT	-	4,3±0,6	-	-	-	4,7±0,7
Pb			**33 µg L^{-1}**			
Controle	<0,56	<0,56	1,9±0,8	<0,56	1,0±0,7	<0,56
Controle SH	<0,56	<0,56	0,8±0,3	<0,56	<0,56	<0,56
Chumbo	34,5±2,9	4,9±1,9	33,0±1,2	8,9±3,5	37,4±6,2	5,5±1,7
Mistura*	30,8±1,0	2,3±1,4	31,2±0,7	4,4±1,5	28,8±0,6	2,5±1,1
SUFT	-	6,9±2,6	-	-	-	-
Fe			**5,0 mg L^{-1}**			
Controle	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Controle SH	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ferro	4,9±0,1	0,6±0,2	3,9±0,2	0,4±0,2	2,2±0,1	0,2±0,1
Mistura*	4,7±0,2	0,4±0,2	4,2±0,2	0,3±0,1	2,0±0,1	0,1±0,1
SUFT	-	0,3±0,1	-	0,3±0,1	-	0,1±0,0

*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

- Não quantificado

Tabela III. Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição.

Aquário	NH_3 (mg L^{-1})		NO_3^{1-} (mg L^{-1})		SO_4^{2-} (mg L^{-1})		PO_4^{3-} (mg L^{-1})	
	I	**F**	**I**	**F**	**I**	**f**	**I**	**f**
Controle	3,6±0,5	<0,21	13,3±0,3	13,3±0,1	6,0±1,4	7,8±1,2	1,8±0,1	2,2±0,2
Ferro	3,3±0,8	<0,21	9,0±0,6	12,8±0,4	6,3±0,9	8,0±0,8	0,5±0,1	0,2±0,1
Cádmio	3,1±0,5	<0,21	13,4±0,2	13,2±0,1	8,1±0,3	9,6±0,5	1,7±0,1	1,9±0,3
Chumbo	3,0±0,5	<0,21	13,4±0,2	13,1±0,1	8,2±0,5	9,8±0,8	1,6±0,0	1,5±0,5
Cobre	3,7±0,3	<0,21	13,3±0,2	13,5±0,1	7,8±0,3	14,1±4,8	1,7±0,0	2,0±0,2
Mistura*	3,0±0,4	<0,21	13,4±0,1	13,6±0,1	7,3±0,6	8,2±1,2	1,7±0,0	1,7±0,0
Experimento com 0,5 mg L^{-1} de SHA								
Controle	<0,21	0,4±0,2	16,3±0,1	17,6±0,2	<5,48	<5,48	1,4±0,1	2,3±0,3
Controle SH	<0,21	0,3±0,1	17,8±0,7	17,5±0,1	<5,48	<5,48	1,3±0,1	2,7±0,4
Ferro	<0,21	0,7±0.4	11,4±0,9	16,6±0,7	<5,48	<5,48	<0,05	1,0±0,7
Cádmio	<0,21	0,6±0,3	17,0±1,3	17,7±0,1	<5,48	<5,48	0,9±0,1	2,5±0,3
Chumbo	<0,21	0,3±0,1	16,2±0,3	17,8±0,2	<5,48	<5,48	1,0±0,2	2,4±0,5
Cobre	<0,21	<0,21	16,1±0,1	17,6±0,1	<5,48	<5,48	1,1±0,1	2,3±0,1
Mistura*	<0,21	<0,21	11,6±0,4	17,3±0,1	<5,48	15,7±3,2	<0,05	0,2±0,1
Experimento com 1,5 mg L^{-1} de SHA								
Controle	<0,21	<0,21	16,7±0,1	17,1±0,6	<5,48	<5,48	2,1±0,7	3,0±0,5
Controle SH	<0,21	<0,21	16,9±0,1	17,3±0,1	<5,48	<5,48	1,7±0,0	2,8±0,3
Ferro	<0,21	<0,21	10,8±0,2	16,5±0,4	<5,48	<5,48	1,0±0,2	0,8±0,2
Cádmio	<0,21	<0,21	17,3±0,1	17,0±0,2	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,1±0,2
Chumbo	<0,21	<0,21	17,4±0,2	17,0±0,1	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,2±0,1
Cobre	<0,21	<0,21	17,3±0,1	17,1±0,2	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,2±0,1
Mistura*	<0,21	<0,21	11,6±0,12	15,8±0,4	<5,48	<5,48	<0,05	0,8±0,3
Experimento com 5,0 mg L^{-1} de SHA								
Controle	<0,21	0,4±0,0	17,7±0,4	16,9±0,3	<5,48	<5,48	1,6±0,0	3,0±0,5
Controle SH	<0,21	0,3±0,2	18,4±0,5	16,7±0,3	<5,48	8,1±1,6	1,7±0,0	2,5±0,3
Ferro	<0,21	<0,21	24,6±1,2	16,7±0,2	<5,48	6,0±1,7	0,1±0,0	0,8±0,5

Cádmio	<0,21	<0,21	18,3±0,2	17,0±0,4	<5,48	7,3±1,1	1,6±0,0	2,9±0,5
Chumbo	<0,21	<0,21	18,6±0,2	17,2±0,5	<5,48	7,7±1,3	1,9±0,5	2,6±0,4
Cobre	<0,21	<0,21	21,0±3,8	16,9±0,3	<5,48	8,6±0,7	1,7±0,0	3,0±0,2
Mistura*	<0,21	<0,21	24,4±0,3	16,7±0,4	<5,48	6,0±1,9	0,2±0,0	1,0±0,3

*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

Tabela IV. Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição.

Aquário	Temperatura (°C)		pH		Turbidez (NTU)		TOC (mg L^{-1})		OD (mg L^{-1})	
	I	F	I	F	I	f	I	F	I	f
	Experimento de 7 dias									
Controle	23,9±0,5	27,0±0,2	6,6±0,3	6,8±0,2	1,5±1,5	1,2±0,2	0,6±0,2	2,0±0,5	6,0±0,8	4,4±0,2
Ferro	24,1±0,1	26,6±0,1	6,0±0,2	6,6±0,1	35±7,3	11,0±3,0	0,7±0,2	1,9±0,4	10,6±1,0	4,2±0,2
Cádmio	23,8±0,1	26,3±0,1	6,3±0,2	6,7±0,1	1,0±0,3	2,7±0,9	0,9±0,3	1,4±0,1	10,3±0,6	4,3±0,2
Chumbo	23,9±0,2	26,7±0,5	6,2±0,1	6,7±0,0	1,0±0,4	3,4±0,8	0,8±0,2	2,6±1,4	8,3±0,6	4,8±0,5
Cobre	24,3±0,2	27,2±0,1	6,3±0,0	6,7±0,1	0,6±0,7	2,0±0,6	1,1±0,5	2,0±0,1	11,2±0,4	4,4±0,1
Mistura*	24,7±0,4	26,6±0,3	6,5±0,1	6,7±0,0	0,7±0,3	1,5±0,4	0,6±0,1	2,7±0,3	13,1±0,4	4,4±0,1
	Experimento com 1,5 mg L^{-1} de SHA									
Controle	27,2±0,0	24,6±0,1	7,4±0,2	8,0±0,0	0,0±0,0	0,8±0,3	1,6±1,0	0,7±0,2	7,5±1,2	6,4±0,1
Controle SH	27,1±0,1	24,2±0,0	7,7±0,1	8,0±0,0	0,0±0,0	1,5±0,5	0,7±0,3	1,1±0,3	6,6±0,2	6,5±0,2
Ferro	26,8±0,0	24,3±0,1	6,9±0,0	7,9±0,0	14,5±3,4	4,4±0,8	1,6±0,6	1,1±0,7	7,1±0,1	6,9±0,1
Cádmio	26,8±0,1	24,4±0,1	7,1±0,1	8,0±0,0	0,0±0,0	1,0±0,6	1,0±0,5	5,6±4,1	8,1±0,1	6,6±0,3
Chumbo	26,8±0,1	24,5±0,1	7,7±0,3	8,0±0,0	0,0±0,1	2,6±1,0	0,3±0,2	0,8±0,2	7,7±0,2	6,9±0,1
Cobre	26,7±0,1	24,4±0,0	7,1±0,1	7,9±0,0	0,1±0,1	1,1±0,4	0,6±0,3	2,6±2,0	7,5±0,2	6,6±0,3
Mistura*	26,9±0,1	24,4±0,0	7,5±0,1	7,9±0,0	11,8±0,7	2,6±0,4	1,0±0,6	6,3±0,9	7,8±0,2	6,8±0,1
	Experimento com 5,0 mg L^{-1} de SHA									
Controle	24,8±0,2	25,7±0,1	7,2±0,1	8,1±0,1	0,4±0,2	0,6±0,5	2,0±1,3	1,2±0,1	6,7±0,4	6,6±0,2
Controle SH	24,5±0,1	25,4±0,0	6,7±0,2	8,0±0,0	0,3±0,1	1,1±0,4	6,1±2,8	16,0±0,8	6,7±0,2	6,7±0,2
Ferro	24,0±0,1	24,9±0,6	7,2±0,0	7,9±0,0	19,9±0,7	2,4±0,4	2,8±1,6	22,1±3,3	6,8±0,1	6,6±0,2
Cádmio	23,8±0,0	25,3±0,0	7,4±0,1	8,0±0,0	0,3±0,3	1,3±0,7	2,6±0,3	40,1±8,8	6,9±0,1	6,7±0,1
Chumbo	23,8±0,0	25,3±0,1	7,5±0,0	8,0±0,0	0,8±0,3	0,8±0,2	2,5±0,3	25,8±3,4	7,3±0,2	6,8±0,2
Cobre	24,2±0,3	25,3±0,0	7,2±0,0	7,9±0,2	0,4±0,3	0,2±0,3	4,3±0,6	21,9±3,3	7,1±0,1	6,9±0,1
Mistura*	23,9±0,0	25,1±0,1	7,2±0,1	7,9±0,0	12,8±2,8	1,8±0,7	4,1±0,3	36,6±5,4	6,7±0,1	6,6±0,1
	Experimento com águas do Rio Preto									
Rio Preto	24,0±0,0	25,1±0,0	7,3±0,2	8,1±0,4	4,9±1,0	1,1±0,4	2,2±0,1	3,3±0,4	6,6±0,2	6,5±0,1

*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

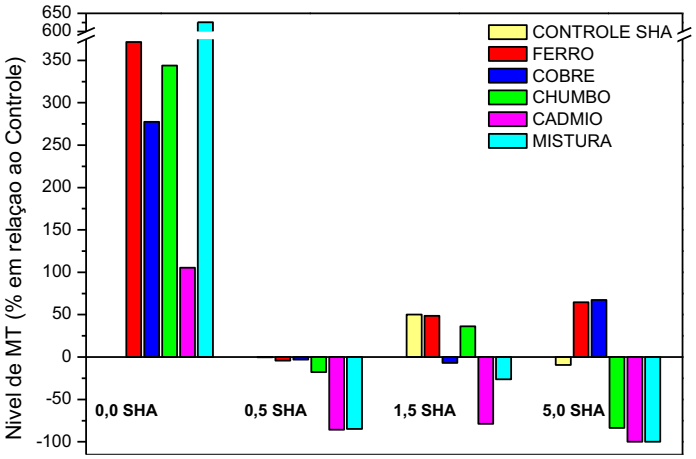


Figura I. Conteúdo de MT hepática em Tilápias expostas durante 7 dias a Ferro, Cobre, Chumbo, Cádmio e Mistura desses metais na ausência e com concentrações de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L^{-1} de SHA. Os resultados estão expressos em porcentagem de indução em relação ao grupo Controle.

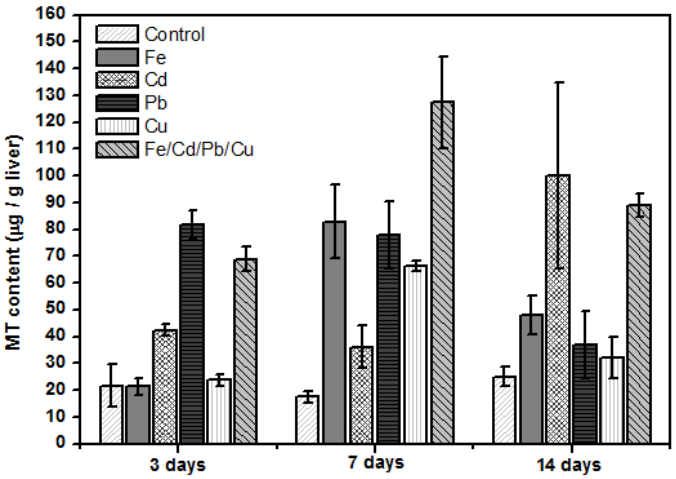


Figura II: Conteúdo de metalotioneínas hepática de tilápias expostas a Fe, Cd, Pb, Cu e à mistura desses metais durante 3, 7 e 14 dias.