

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Campus UFRJ-MACAÉ PROFESSOR ALOÍSIO TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE DANIO RERIO
(TELEOSTEI, CYPRINIDAE) SOB EFEITO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS OU
BIOATIVAS DE ÁGUAS POLUÍDAS

Rhennã Nascimento Da Silva

2015

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE DANIO RERIO
(TELEOSTEI, CYPRINIDAE) SOB EFEITO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS OU
BIOATIVAS DE ÁGUAS POLUÍDAS.

Rhennã Nascimento da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Natália Martins Feitosa

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Macaé

Março, 2015

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE DANIO RERIO
(TELEOSTEI, CYPRINIDAE) SOB EFEITO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS OU
BIOATIVAS DE ÁGUAS POLUÍDAS.

Rhennã Nascimento da Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Natália Martins Feitosa

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Dr.^a Natália Martins Feitosa (UFRJ-Macaé).

Titular Externo, Dr.^a Maria Inês Paes Ferreira (IFF – Macaé).

Suplente Externo, Dr. Moisés Basilio da Conceição (UFRJ-Macaé).

Titular Interno, Dr.^a Ana Cristina Petry (UFRJ-Macaé).

Suplente Interno, Dr. Mauricio Mussi Molisani (UFRJ-Macaé).

Macaé
Março, 2015

Dedico esta dissertação aos meus pais,
Jorge e Maria Conceição, que sempre foram a minha
inspiração de continuar lutando pela realização dos meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus por ter sido o meu ajudador nas horas difíceis. Dando-me forças para continuar perseverando na realização dos meus sonhos.

A minha família e amigos pelo incentivo e apoio incondicional. Em especial, destaco alguns amigos que sempre estiveram próximos quando precisei: Mariana Huguet, Laís Ventura, Helena Souza, Paula Veronesi e Daiani Campbell.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro que mais uma vez abriu as portas para mim, acreditando no meu empenho e potencial, o meu muitíssimo obrigado. Registro aqui, em poucas palavras, que reconheço o meu aprendizado durante esses dois anos de mestrado como algo que mudou a minha vida. Essa mudança me fez estar mais apaixonado do que já era pela minha profissão de professor e biólogo. O sentimento de ver um trabalho concluído e que o conhecimento gerado por ele contribui para algo maior, não tem preço.

A minha orientadora Natália Martins Feitosa e meu co-orientador Rodrigo Nunes da Fonseca pelo suporte no pouco tempo que lhes coube, pelas suas correções e incentivos. Se estou prestes a realizar mais esse sonho, e mais uma etapa da minha carreira, só está sendo possível graças a vocês.

A todos os professores que contribuíram de alguma forma para a minha formação. Entretanto, gostaria de mencionar alguns em especial: prof.^a Ana Cristina Petry, prof. Heitor Monteiro Duarte, prof. Francisco de Assis Esteves e o prof. Marcos Paulo Figueiredo de Barros. Esses professores se destacaram como mestres e amigos na minha jornada pelo mundo acadêmico. Toda vez que entro numa sala de aula, seja como aluno ou como professor, me espelho em vocês no sentido da responsabilidade, do comprometimento, da moral e da ética. Sou muitíssimo grato a todos por tudo que me ensinaram.

Agradeço a FAPERJ pelo financiamento do projeto e o CENPES pela bolsa de incentivo ao mestrado. Sem o apoio dessas instituições, a realização do estudo desse projeto não teria sido possível.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

"Mas na profissão, além de amar tem de saber.
E o saber leva tempo pra crescer." (Rubem Alves)

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Rhennã Nascimento da.

Avaliação da morfologia e expressão gênica de biomarcadores durante o desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) sob efeito de substâncias tóxicas ou bioativas de águas poluídas./ Rhennã Nascimento da Silva. – Macaé: UFRJ/ Macaé Prof. Aloísio Teixeira, 2015.

61f.: il.

Orientadora: Natália Martins Feitosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Macaé, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 80-88.

1. Hidrocarboneto Policíclico Aromático. 2. Metais Pesados. 3. Toxicologia. 4. Expressão Gênica. 5. *Danio rerio*. I. Feitosa, Natália Martins. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus – Macaé Prof. Aloísio Teixeira, Macaé, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Avaliação da morfologia e expressão gênica de biomarcadores durante o desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) sob efeito de substâncias tóxicas ou bioativas de águas poluídas.

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE DANIO RERIO
(TELEOSTEI, CYPRINIDAE) SOB EFEITO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS OU
BIOATIVAS DE ÁGUAS POLUÍDAS.

Rhennã Nascimento da Silva

Orientadora: Natália Martins Feitosa

Co-orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

A contaminação de águas superficiais por agentes tóxicos acontece principalmente através do lançamento de efluentes. Dentre os agentes tóxicos mais conhecidos estão os compostos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) e os metais. Para avaliar os efeitos provocados por esses agentes, o local selecionado para coleta das amostras de efluentes estão localizados na lagoa de Imboassica e no canal Macaé-Campos, ambos na cidade de Macaé/RJ. O objetivo é avaliar alterações na expressão gênica de biomarcadores e na morfologia, considerando a letalidade e os efeitos em doses subletais no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio*. Os experimentos foram conduzidos utilizando o teste de toxicidade aguda em embriões. O tempo total de exposição dos embriões ao teste foi de 96 horas contando a partir da fertilização. Os ensaios foram preparados com diluições seriadas do efluente e o controle negativo contendo meio do embrião E3. Os testes com os biomarcadores foram realizados utilizando o gene β -actina como gene referência, o gene *citocromo p450 1a1* (*cyp1a1*) expresso na presença de HAP e o gene *metalotioneina2* (*mt2*) expresso quando o organismo é exposto a metais. Na lagoa Imboassica, os resultados do teste com embriões mostraram desenvolvimento normal, não havendo diferenças com o controle negativo. No canal Macaé-Campos, os resultados do teste com embriões apresentaram mortalidade, edema no pericárdio, atrasos no desenvolvimento, consumo irregular do vitelo e má-formação do crânio e face. Em relação aos testes com os biomarcadores, o gene *cyp1a1* aumentou sua expressão indicando a presença de HPA na amostra do canal; enquanto, o gene *mt2* diminuiu sua expressão. Novos testes são necessários para avaliar se existe alguma relação entre as expressões dos genes *cyp1a1* e *mt2* ou se a presença de HPA interfere em alguma via metabólica que interrompa a expressão do gene *mt2*.

Palavras-chave: 1. Hidrocarboneto policíclico aromático. 2. Metais pesados. 3. Toxicologia. 4. Expressão gênica. 5. *Danio rerio*.

Macaé

Março, 2015

EVALUATION OF MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION OF BIOMARKERS
DURING THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF DANIO RERIO (TELEOSTEI,
CYPRINIDAE) UNDER EFFECT OF TOXIC SUBSTANCE OR BIOACTIVE
POLLUTED WATER.

Rhennã Nascimento da Silva

Orientadora: Natália Martins Feitosa

Co-orientador: Rodrigo Nunes da Fonseca

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Contamination of surface water by toxic agents occurs primarily through discharge of effluents. Among the best known toxic agents are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and metals compounds. To evaluate the effects of such agents, the lagoon of Imboassica and Macaé-Campos canal was selected for collecting samples of effluents, both in the city of Macaé / RJ. The objective is to evaluate changes in gene expression of biomarkers and morphology, considering the lethality and effects at sublethal doses in embryonic development of zebrafish. The experiments were conducted using the acute toxicity test in embryos. The total exposure time of embryos to test was 96 hours counting from fertilization. Assays were prepared with serial dilutions of the effluent and the negative control containing embryo medium E3. Tests with biomarkers were performed using *β-actin* gene as reference gene, the *cytochrome p450 1A1* gene (*cyp1a1*) expression in the presence of PHA and *metalotioneina2* gene (*mt2*) expressed when the organism is exposed to metals. In Imboassica lagoon, the test results with embryos showed normal development, with no differences with the negative control. In Macaé-Campos canal, the test results showed embryo mortality, edema in the pericardium, developmental delays, irregular consumption of the calf and malformation of the skull and face. With regard to testing biomarkers, the *cyp1a1* gene increased its expression indicating the presence of HPA in the canal sample; while the *mt2* gene expression decreased. Further tests are necessary to assess whether there is any relationship between the expressions of genes *cyp1a1* and *mt2* or the presence of PAH interfere in some metabolic pathway that disrupts the expression of the gene *mt2*.

Keywords: 1. Polycyclic aromatic hydrocarbon. 2. Heavy metals. 3. Toxicology. 4. Gene expression. 5. *Danio rerio*.

Macaé

Março, 2015

Índice de Figuras

Figura 1 - (A) Desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* desde a primeira célula até o período de 72 h pós-fertilização. As setas indicam o surgimento de novas características morfológicas referente ao tempo de desenvolvimento. (B) Estágio larval com 96 horas de desenvolvimento normal com descrição de suas principais características. Fonte: (A) adaptado de Kimmel *et al.* (1995); (B) autoria própria. 23

Figura 2 - Defesa química celular. Biotransformações de substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas. Linhas sólidas indicam caminhos possíveis para substâncias tóxicas exógenas; linhas pontilhadas representam possíveis induções de genes em resposta a receptores de estresse-ativados; linhas tracejadas com pontos indicam possíveis fontes de produção endógena estimulada por substâncias tóxicas de oxigênio reativo. Fonte: modificado de Goldstone *et al.* (2006). 27

Figura 3 - Representação esquemática da ativação do receptor de Ah e expressão do gene *citocromoP450 1A1* por benzo(a)pireno. Fonte: modificado de Leaver (1996). 28

Figura 4 – Lagoa de Imboassica em fevereiro de 2010 (A), fevereiro de 2013 (B) e outubro de 2014 (C). Dados do IBGE indicam que o crescimento urbano no entorno da lagoa duplicou de tamanho. A seta em vermelho indica o local onde foi realizado a coleta de efluentes. 36

Figura 5 – (A) Local de coleta da amostra de efluentes que desembocam no Canal Macaé-Campos (círculo vermelho). (B) As amostras são coletadas antes de se diluírem na saída da manilha que conduz o efluente até o canal. (C-D) Em frente ao ponto de coleta existe um terreno com reservatórios de efluentes trazidos por caminhões coletores. Esses efluentes desembocam no canal sem tratamento prévio. 37

Figura 6 - Esquema dos processos de realização do ensaio de toxicidade utilizando embriões de *Danio rerio*. Da esquerda para a direita: coleta dos ovos (A), separação entre fertilizados e não-fertilizados (B), e distribuição de ovos fertilizados nas placas de 24 poços contendo as soluções testes (C). FONTE: adaptado de Lammer *et al.* (2009), p. 198. 39

Figura 7 – Esquema da distribuição dos testes de concentração e controle negativo. O controle negativo (C, contendo o meio de embrião E3) é igualmente distribuído nas placas do experimento a fim de identificar peculiaridades específicas das placas. No esquema acima, os poços em cor preta e sem numeração não são utilizados. FONTE: adaptado de Lammer *et al.* (2009), p. 199. 40

Figura 8 – Resultados da mortalidade de embriões de *Danio rerio* expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado após oito dias da coleta de amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn. 49

Figura 9 – 1º Experimento (10/04/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os

símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.....	51
Figura 10 - Resultados da mortalidade de embriões de <i>Danio rerio</i> expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado trinta e sete dias após a coleta da amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.	52
Figura 11 – 2º Experimento (08/05/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.....	53
Figura 12 - Resultados da mortalidade de embriões de <i>Danio rerio</i> expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado cinquenta dias após a coleta da amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.	54
Figura 13 – 3º Experimento (22/05/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.....	55
Figura 14 – Comparação da mortalidade dos embriões expostos ao efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos nos três ensaios toxicológicos. Os ensaios aconteceram em momentos diferentes. O primeiro ensaio iniciou com oito dias após a coleta do efluente; o segundo experimento com 37 dias após a coleta; e o terceiro experimento com 50 dias após a coleta. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. As barras indicam a soma total dos embriões afetados em cada experimento separados por tratamento. Os símbolos representam as diferenças obtidas entre os experimentos através do teste estatístico de Dunn.....	56
Figura 15 – Expressão gênica de <i>cyp11a1</i> . Embriões expostos ao efluente coletado no canal Macaé-Campos no mês de abril, oito dias após a coleta. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.....	57
Figura 16 – Expressão gênica de <i>mt2</i> . Embriões expostos ao efluente coletado no canal Macaé-Campos no mês de abril, oito dias após a coleta. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.	57
Figura 17 - Análise da morfologia dos embriões em 24 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de <i>Danio rerio</i> expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de abril de 2014. As imagens de A-F estão representando o desenvolvimento em 24hpf. (A) controle negativo (CTRL): apresentou desenvolvimento normal de acordo com o proposto por Kimmel <i>et al.</i> (1995). (B) diluição com 40% de efluente: o desenvolvimento foi parecido com CTRL. Na diluição com 60% (C-D) e 80% (E-F) de efluente, os embriões apresentaram atrasos em	

diferentes estágios quando comparados com o CTRL. A escala está representada por um traço negro e corresponde a 1 milímetro..... 58

Figura 18 – Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de abril de 2014. As imagens de G-L estão representando o desenvolvimento em 96hpf. (G) controle negativo (CTRL): normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). O CTRL apresentou bexiga natatória inflada (seta amarela). (H-I) diluição com 40% de efluente: atraso no desenvolvimento e desenvolvimento de edema no pericárdio (seta em vermelho). Na diluição com 60% (J) e 80% (L) de efluente houve má-formação do crânio e da face (seta em azul), consumo irregular do vitelo (seta em verde), formação de edema no pericárdio (seta em vermelho) e atraso no desenvolvimento. A escala representada por um traço negro (L) corresponde a 1 milímetro e se aplica a todos os embriões..... 59

Figura 19 - Análise da morfologia dos embriões em 48 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. As imagens de A-E estão representando o desenvolvimento em 48 horas pós-fertilização (hpf). (A) controle negativo (CTRL): apresentou desenvolvimento normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). (B) diluição com 20% de efluente: estágio high pec (42h). (C) diluição com 30%: estágio de 18-somite (18h). (D) diluição com 40% de efluente: estágio de 3-somite (11h). (E) diluição com 60% de efluente: estágio de germ-ring (5,7h). Todas as diluições apresentaram atraso no desenvolvimento. A escala está representada por um traço negro e corresponde a 1 milímetro..... 60

Figura 20 – Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Sem alteração no amostra de efluente. As imagens de F-I estão representando o desenvolvimento em 96hpf. (F) controle negativo (CTRL): normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). O CTRL apresentou bexiga natatória (seta amarela) inflada. (G) diluição com 20% de efluente: atraso no desenvolvimento, consumo irregular do vitelo (seta em verde) e má-formação do crânio e face. (J) diluição com 30% de efluente: estágio prism-6 (25h). (L) diluição com 40% de efluente: estágio 10-somite (14h). A escala representada por um traço negro corresponde a 1 milímetro e se aplica a todos os embriões..... 61

Figura 21 – 1º Experimento (25/10/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas através do teste estatístico de Dunn. 62

Figura 22 - Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Amostra de efluente aerada. O controle negativo (CTRL) está representado na imagem A, e apresenta desenvolvimento normal. A imagem B apresentou estágio igual ao CTRL (96h). A imagem C mostra o desenvolvimento do embrião exposto à diluição C30 com estágio em long pec (48h). Em D a diluição usada foi C40 e o estágio alcançado pelo embrião foi entre long pec (48h). Na imagem E a diluição C60 provocou atraso no desenvolvimento no embrião, alcançando apenas o estágio de 18-somite (18h). As setas em azul indicam a má-formação do

crânio e face. As setas em verde apontam a grande quantidade de vitelo. A grande quantidade de vitelo indica consumo irregular..... 64

Figura 23 – 2º Experimento (04/11/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Diferente do primeiro ensaio, neste o efluente foi aerado antes de iniciar por 3h30min. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas através do teste estatístico de Dunn. 65

Figura 24 – Análise da morfologia dos embriões de *Danio rerio* em 96 horas pós-fertilização (hpf) expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Amostra de efluente filtrada. O controle negativo (CTRL) está representado na imagem A, e apresenta desenvolvimento normal. A imagem B apresentou estágio igual ao CTRL (96h com a bexiga natatória inflada). A imagem C mostra o desenvolvimento do embrião exposto a diluição C30 com estágio em protruding mouth (72h). Em D a diluição usada foi C40 e o estágio alcançado pelo embrião foi entre pec fin (60h) e protruding mouth (72h). Na imagem E a diluição C60 provocou atraso no desenvolvimento no embrião, alcançando apenas o estágio de prism-16 (31h). As setas em amarelo indicam a bexiga natatória. As setas em verde apontam a grande quantidade de vitelo. A grande quantidade de vitelo indica consumo irregular..... 67

Figura 25 – 3º Experimento (11/11/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Diferente do primeiro ensaio, neste ensaio, o efluente foi filtrado antes de iniciar. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas com o teste estatístico de Dunn. 68

Figura 26 – Comparação da mortalidade dos embriões expostos ao efluente coletado em outubro no canal Macaé-Campos nos três ensaios toxicológicos. As barras representam o somatório total de embriões (valores em %). Os ensaios aconteceram em momentos diferentes. O primeiro ensaio iniciou no dia 25/10/2014; o segundo no dia 04/11/2014; e o terceiro no dia 11/11/2014. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. Os símbolos representam as diferenças entre os experimentos realizados em momentos diferentes. Essas diferenças foram obtidas através do teste estatístico de Dunn. 69

Figura 27 – Experimento realizado com efluente coletado na Lagoa Imboassica (22/07/2014). (A) Controle negativo. (B) Diluição C60. (C) Diluição C80. As imagens A, B e C apresentam o mesmo estágio de desenvolvimento, entre 72 e 96 hpf. O efluente não apresentou agentes tóxicos capazes de alterar a morfologia dos embriões. 71

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais características de alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário e larval de *Danio rerio* sob exposição de agentes tóxicos. Adaptado de Lammer *et al.* (2009). 25

Tabela 2 – Dados do IBGE indicam que o número de pessoas residentes em alguns bairros do município duplicaram de tamanho. 37

Tabela 3 - As sequencias dos *primers* foram retiradas de Liedtke *et al.* (2008). 42

Tabela 4 - Configuração do termociclador para a síntese de cDNA.	44
Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas das amostras de efluentes coletados no canal Macaé-Campos.	47
Tabela 6 - Resultado da análise de metais pesados na amostra de água coletada no dia 02/04/2014 e 15/10/2014 comparados aos padrões de lançamento de efluentes pelas RESOLUÇÕES CONAMA (2005) e CONAMA (2011). Os seguintes elementos apresentaram concentração abaixo do limite de detecção (<0,001 mg/L): Ag, Au, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cs, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ge, Hf, Hg, Ho, In, Ir, La, Lu, Mo, Nb, Nd, Os, Pd, Pr, Pt, Re, Rh, Ru, Sb, Sm, Ta, Tb, Te, Th, Tl, Tm, U, Y, Yb, Zr. Os valores em amarelo destacam valores superiores ao proposto para qualidade da água por CONAMA (2005).	48
Tabela 7 – Primeiro ensaio toxicológico. Variações de oxigênio e pH na amostra do mês outubro durante 96hpf.	60
Tabela 8 - Variações de oxigênio e pH na amostra do mês outubro durante 96hpf. Estas condições foram observadas após aeração do efluente durante 3h30min para a realização do segundo ensaio toxicológico.	63
Tabela 9 – Resultados do oxigênio dissolvido, pH e temperatura no experimento com amostra filtrada durante 96hpf. Amostra coletada no canal Macaé-Campos em outubro.	66
Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas das amostras de efluentes coletados na Lagoa Imboassica.	70
Tabela 11 – Resultados do oxigênio dissolvido, pH e temperatura no experimento com amostra durante 96hpf. Amostra coletada na lagoa Imboassica.	70

Lista de Siglas

Ah – *Arylhydrocarbon*

AHR – Receptor *Arylhydrocarbon*

Al – Alumínio

ARNT – Ah receptor nuclear translocator

As – Arsênio

C20 – Diluição com 20% de efluente somado a 80% de E3

C30 – Diluição com 30% de efluente somado a 70% de E3

C40 – Diluição com 40% de efluente somado a 60% de E3

C60 – Diluição com 60% de efluente somado a 40% de E3

C80 – Diluição com 80% de efluente somado a 20% de E3

Ca – Cálcio

Cd – Cádmiio

Co – Cobalto

Cr – Cromo

CTRL – Controle negativo

DNA – Deoxyribonucleic acid ou ácido desoxirribonucleico

E3 – Meio do embrião

FAD – Dinucleótido de flavina e adenina

Fe – Ferro

FMN – Mononucleótido de flavina

Gb – Gigabase

Gene *cyp1a1* – Gene *citocromo P450 1A1*

Gene *mt* – Gene *metalotioneína*

Hg – Mercúrio

HPAHs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos halogenados

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

K – Potássio

Labspectro – Laboratório de espectrometria atômica

LICM – Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

MT – Proteína de metalotioneína

mt-1 – Gene *metalotioneína 1*

mt-2 – Gene *metalotioneína 2*

N – Nitrogênio

Na – Sódio

NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase ou nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase

Ni – Níquel

P – Fósforo

Pb – Chumbo

qRT-PCR – Técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativo

RNA – Ribonucleic acid ou ácido ribonucleico

Sn – Estanho

TCDD – 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Ti – Titânio

W – Tungstênio

Zn – Zinco

Sumário

Introdução	19
Poluição e a ciência da toxicologia	19
Utilizando o peixe-zebra como organismo modelo.....	22
Expressão gênica como ferramenta de monitoramento de poluição no ambiente aquático	26
Toxicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	30
Toxicidade dos metais.....	32
Macaé – “capital do petróleo”	33
Lagoa Imboassica	33
Canal Macaé-Campos	35
Objetivo.....	37
Materiais e Métodos.....	38
Manutenção dos reprodutores	38
Produção de ovos	38
Água de diluição	39
Coleta e caracterização físico-química das amostras de efluentes	39
Teste de toxicidade com embriões de peixes	40
Coleta e diluição dos efluentes.....	41
Canal Macaé-Campos	41
Lagoa Imboassica.....	41
Preparação das amostras para o teste de toxicidade utilizando biomarcadores.....	42
Desenho dos <i>primers</i>	42
Extração de RNA	42
Síntese do DNA complementar (ou cDNA).....	44
Reação em cadeia da polimerase “quantitativo em tempo real” (qRT-PCR em tempo real)	44
Preparação dos embriões para fotografia	45
Estatística	45
Resultados	46
Resultados das características físico-química dos efluentes coletados no Canal Macaé- Campos.....	46
Resultados obtidos com o efluente coletado em abril	49
Primeiro ensaio toxicológico.....	49
Segundo ensaio toxicológico.....	51
Terceiro ensaio toxicológico	53

Comparação da mortalidade nos três ensaios toxicológicos	55
Resultados dos testes com os biomarcadores	56
Resultados das alterações morfológicas	57
Resultados obtidos com o efluente coletado em outubro	59
Primeiro ensaio toxicológico.....	59
Segundo ensaio toxicológico.....	62
Terceiro ensaio toxicológico	65
Comparação da mortalidade nos três ensaios toxicológicos	68
Resultados das análises físico-química do efluente coletado na Lagoa Imboassica e das alterações morfológicas observadas nos embriões	69
Discussão.....	71
Parâmetros físico-químicos dos efluentes	71
Metais pesados	74
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	75
Alterações morfológicas.....	77
Conclusão	80
Referências	81

Introdução

Poluição e a ciência da toxicologia

O investimento realizado na indústria química brasileira tem crescido nas últimas décadas em números expressivos. A Associação Brasileira da Indústria Química e associações de segmentos específicos realizaram levantamentos sobre o faturamento líquido gerado pelo setor ao longo desses anos. No ano 2000, o faturamento líquido foi de R\$79,8 bilhões; em 2005 de R\$176,1 bilhões; em 2010 de R\$225,9 bilhões e em 2013 R\$335,9 bilhões. Esses valores indicam o crescimento do setor tanto na quantidade como na inovação de produtos químicos. Essas substâncias estão sendo disponibilizadas comercialmente para uso doméstico e industrial (Abiquim, 2014).

Para muitas dessas substâncias, ainda não há registros sobre sua interação com o meio ambiente. Estimativas feitas pela Sociedade Americana de Química indicam estudos científicos de dez milhões de substâncias químicas, das quais 70 mil são de uso cotidiano. Anualmente, duas mil novas substâncias são adicionadas a esta lista. Devido a várias dificuldades de gerar conhecimento sobre esses compostos, apenas duas mil substâncias já tiveram seus efeitos tóxicos registrados. Estes desconhecimentos dos efeitos tóxicos de substâncias dificultam a resolução de problemas em casos de acidentes ambientais (Mozeto, 2008).

A porta de entrada desses agentes tóxicos no meio ambiente ocorre através do descarte de efluentes domiciliar e/ou industrial (Manoli e Samara, 1999), por águas pluviais (Hoffman *et al.*, 1984; Wu *et al.*, 2014) ou ainda através de atividades econômicas como a pecuária (Hamscher, 2006) e a agricultura (Pallade *et al.*, 1960; Weston *et al.*, 2004). Direta ou indiretamente, essas fontes potenciais de poluentes estão aptas a contaminar ecossistemas aquáticos e terrestres. No Brasil, a lei nº 6.938, de 31 de Agosto de 1981 define poluição como “*degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; afetem desfavoravelmente a biota; afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente; lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos*”.

Em alguns casos onde os ecossistemas aquáticos foram ou estão sendo contaminados, podemos observar várias fontes de lançamento de efluentes com possíveis misturas de efluentes domésticos e industriais (Rand, 1995). Essas misturas de contaminantes orgânicos e inorgânicos são complexas e algumas combinações quando simuladas em laboratórios tem demonstrado interações sinérgicas (Nys *et al.*, 2015) ou antagônicas (Kszos *et al.*, 2003), de potenciação (Kefalas e Stacey, 1991) e de adição (Madden *et al.*, 2002; Fowler *et al.*, 2004) sobre a biota.

Os agentes poluentes quando produzem toxicidade, raramente apresentam um evento molecular simples, mas eventos em cascata. Tais eventos em cascata iniciam-se com exposição aos organismos presentes no ambiente contaminado, seguem com o metabolismo e a distribuição, finalizam com a interação entre macromoléculas (geralmente proteínas ou DNA) e a expressão de um fenótipo causado pelo tóxico (Hodgson, 2004). Em algumas situações, os tóxicos podem sofrer biotransformações por meio de mecanismos de excreção e/ou de reparo. Esses mecanismos são capazes de produzir metabólitos que podem ser excretados diretamente ou se tornar substrato para outras reações (O'Flaherty, 2003). Assim, o agente tóxico pode ser inativado ou desintoxicado, ou ainda, pode ser transformado em substâncias bioativas ainda mais tóxicas (Franklin e Yost, 2003).

Essas informações têm sido registradas pelas ciências toxicológicas. A toxicologia estuda os possíveis efeitos adversos produzidos por substâncias químicas ou agentes físicos em organismos vivos, sob condições específicas de exposição, empenhando todo o seu esforço em descobrir qualitativa e quantitativamente os riscos associados ao tóxico (James *et al.*, 2003). Para se avaliar a toxicidade de qualquer agente tóxico é necessário considerar cinco componentes básicos: seleção de um organismo teste, a escolha de uma resposta para medir (incluindo a metodologia a ser usada), período de exposição, a duração do teste (período de observação) e uma série de doses para testar (Hodgson, 2004; Klaassen, 2008).

O ensaio de toxicidade pode ser executado de diferentes maneiras. Dentre elas, pode ser realizado diretamente no meio ambiente ou em laboratório. No meio ambiente, o agente tóxico estará sujeito às variações dos parâmetros físico-químicos reais encontrados na natureza. No laboratório, os mesmos parâmetros físico-químicos são possíveis de serem controlados. Além do local, é preciso avaliar qual organismo se

ajusta melhor as condições dos experimentos, de maneira que as respostas sejam precisas e significativas. Essa escolha será fortemente influenciada pela pergunta a ser respondida no trabalho. É possível utilizar organismos capturados no seu hábitat afetado ou utilizar organismos mantidos em laboratório. A diferença entre ambos se dá principalmente pela variação genética existente em cada grupo (James *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2009). Entretanto, a fim de melhorar o desenho experimental, alguns cientistas procuram usar organismos geneticamente idênticos. Isso diminui os erros dos testes, considerando apenas os efeitos causados pelo agente tóxico (Roe, 1993). Os experimentos também podem ser desenhados para utilizar linhagens de células (*in vitro*) ou o organismo (*in vivo*). Entretanto, é preciso ter em mente que existem limitações na utilização de sistemas *in vitro*. Os experimentos *in vitro* não propiciam as mesmas condições do meio natural das células no corpo do organismo e são dependentes da disponibilidade de linhagens celulares apropriadas ao ensaio. Ao contrário dessas limitações, os organismos quando usados por inteiro produzem resultados mais consistentes, principalmente se o sistema da espécie modelo permitir manipulação das funções dos genes. Esses animais não só terão o meio mais sensível a interagir com os agentes tóxicos, como também permitirão desvendar os mecanismos genéticos e celulares (Yang *et al.*, 2009). Além da escolha do sistema, se *in vitro* ou *in vivo*, ainda precisamos entender qual o objetivo da pesquisa, se é avaliar os efeitos tóxicos no funcionamento do organismo, ou estudar as perturbações susceptíveis de ecossistemas naturais ou seus componentes (Nikinmaa, 2014). Assim, os estudiosos conseguem obter respostas relacionadas à ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios de agentes químicos (Klaassen, 2008).

Nos casos em que se adotam organismos inteiros, uma alternativa possível e que se tem visto em prática é a utilização de embriões de *Danio rerio* sendo usado em testes de toxicidade (Nagel, 2002). Sendo um dos organismos-modelo mais utilizados na atualidade, se tornou um recurso material pensado com a finalidade de estudar fenômenos biológicos considerando processos genéticos e de desenvolvimento. As informações obtidas com esses organismos, geralmente possibilitam entender o funcionamento de mecanismos fundamentais compartilhados por outras espécies, incluindo o homem (Dietrich *et al.*, 2014).

Utilizando o peixe-zebra como organismo modelo

O *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae), conhecido também como peixe-zebra, tornou-se um modelo importante e já tem grande quantidade de informações de diversas áreas das ciências. Começou a ter o seu genoma sequenciado desde 2001 pelo WellcomeTrust Sanger Institute. Atualmente, a quantidade de dados obtidos através deste projeto alcança o tamanho total de 1.412 gigabases (Gb), sendo o vertebrado com maior número de genes codificadores de proteínas sequenciado. Comparando diretamente com os seres humanos, dos 71.4% dos genes humanos pelo menos um é ortólogo no peixe-zebra, assim como, 69% dos genes de peixe-zebra possuem pelo menos um ortólogo nos genes humanos. E entre os genes ortólogos, 47% dos genes humanos têm relação de um-para-um com um ortólogo de peixe-zebra (Howe *et al.*, 2013). Genes ortólogos são genes em duas espécies que surgiram a partir do mesmo gene em ancestral comum a elas (Hartwell *et al.*, 2011). Assumindo a premissa de que diferentes espécies possuem genes com mesmas funções, nos possibilitam adotar uma delas para desenvolver estudos em que os resultados possam ser extrapolados a outras. Como em muitos casos a utilização do ser humano em pesquisas de toxicidade torna-se inviável e antiético, utilizamos assim outras espécies como modelo.

A espécie *Danio rerio* oferece além do conhecimento de suas informações genéticas outras inúmeras vantagens. Por exemplo, o tamanho do indivíduo adulto aproximado entre 3-5 cm, o crescimento rápido, e a maturidade em torno de três meses. Esta espécie é fácil de ser adquirida, e dentre os vertebrados é a espécie que apresenta menor custo de manutenção e menor esforço para mantê-las saudáveis no laboratório. Em condições ideais, uma fêmea consegue depositar entre 50-200 ovos por dia, e sua recuperação requer apenas uma semana para obter a mesma quantidade de ovos novamente. Além disso, possui fecundação externa e os ovos proporcionam as vantagens de serem não aderentes e transparentes (Hill *et al.*, 2005). O desenvolvimento embrionário (FIGURA1) é bem descrito (Kimmel *et al.*, 1995). E assim, o peixe-zebra se tornou um modelo importante para o estudo sobre o desenvolvimento biológico dos vertebrados (Nusslein-Volhard, 1994; Westerfield, 1995). Devido as informações já registradas sobre o seu desenvolvimento, os embriões de peixe-zebra têm sido usados para observar os efeitos que as misturas de substâncias químicas disponíveis nos efluentes podem provocar (Nagel, 2002).

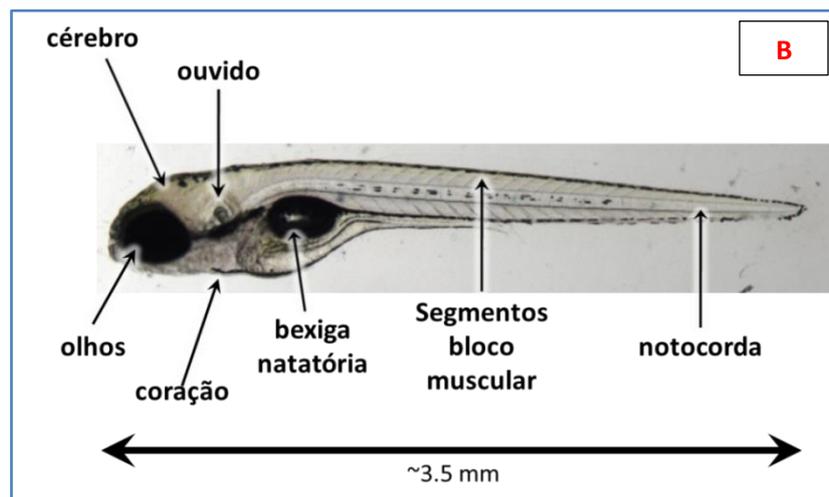
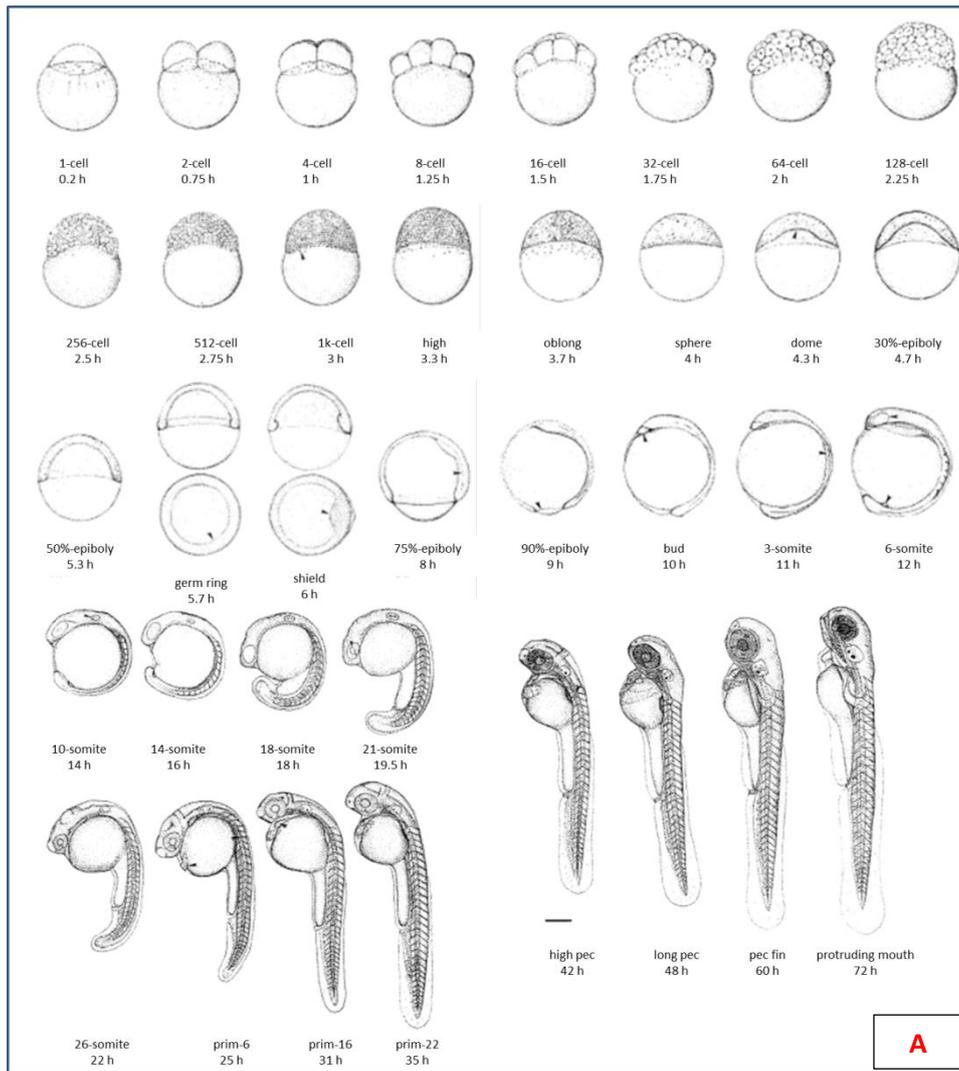


Figura 1 - (A) Desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* desde a primeira célula até o período de 72 h pós-fertilização. As setas indicam o surgimento de novas características morfológicas referente ao tempo de desenvolvimento. (B) Estágio larval com 96 horas de desenvolvimento normal com descrição de suas principais características. Fonte: (A) adaptado de Kimmel *et al.* (1995); (B) autoria própria.

Quando o objetivo é avaliar respostas severas e rápidas a agentes tóxicos, aplicamos ensaios de toxicidade aguda (Birge *et al.*, 1985). Os ensaios podem iniciar na fase embrionária e seguir até a fase larval, não ultrapassando o período de 96 h pós-fertilização (ABNT, 2011; OECD, 2013). Neste estágio, o embrião já possui todos os órgãos completos, inicia a atividade de natação e a bexiga natatória começa a inflar (FIGURA 1-B). Na TABELA 1 estão apresentadas as possíveis alterações decorrentes da exposição a agentes tóxicos de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião (Lammer *et al.*, 2009).

Associado ao desenvolvimento embrionário, técnicas relacionadas à expressão e inibição de genes também tem sido desenvolvidas (Chen *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2006; Timme-Laragy *et al.*, 2007). Nas avaliações toxicológicas, essas técnicas tem possibilitado identificar o grupo de substâncias atuantes e o tipo celular onde ocorrem as alterações.

Tabela 1 - Principais características de alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário e larval de *Danio rerio* sob exposição de agentes tóxicos. Adaptado de Lammer *et al.* (2009).

Tempo de Exposição	8h	24h	48h	96h	108/120h
Fenótipo Letais					
Coagulação	x	x	x	x	
Não destacamento da cauda		x	x	x	
Nenhuma formação de somitos		x	x	x	
Nenhum batimentos cardíacos			x	x	
Falta de eclosão					x
Fenótipos Subletais no Desenvolvimento					
Conclusão da gástrula	x				
Formação de somitos		x			
Desenvolvimento dos olhos		x	x	x	
Movimento espontâneo		x	x	x	
Batimento cardíaco/circulação do sangue			x	x	
Frequência cardíaca			x	x	
Pigmentação			x	x	
Formação de edemas			x	x	
Fenótipos de Teratogenicidade					
Má formação da cabeça		x	x	x	
Má formação dos otolitos		x	x	x	
Má formação da cauda		x	x	x	
Má formação do coração		x	x	x	
Modificações na estrutura da notocorda		x	x	x	
Deformações do saco vitelínico		x	x	x	
Retardo do crescimento em geral		x	x	x	

Expressão gênica como ferramenta de monitoramento de poluição no ambiente aquático

Para evitar ou minimizar os efeitos causados pela toxicidade, as células de um organismo possuem um sistema de defesa próprio. Nesse sistema existem proteínas e processos com funções de proteger o metabolismo celular contra possíveis efeitos deletérios. Os genes responsáveis pela transdução de enzimas atuantes na defesa podem ser especialmente importantes para os embriões, no qual devem lidar com o meio ambiente durante os estágios mais sensíveis de diferenciação e desenvolvimento (Goldstone *et al.*, 2006).

O sistema de defesa celular (FIGURA 2) inclui receptores solúveis e outros fatores de transcrição ativados por ligantes (Sorg, 2014) que atuam como sensores celulares de agentes tóxicos ou danos; enzimas de biotransformações oxidativas (Li *et al.*, 2002), redutivas (Ward e Young, 1990; Mikalsen *et al.*, 1991) ou conjugadas (Wolf *et al.*, 1984) que transformam substâncias químicas em metabólitos menos tóxicos e facilmente excretados; transportadores de efluxo (Lusin *et al.*, 2015; Nornberg *et al.*, 2015) que ativamente exportam substratos da célula; e enzimas antioxidantes (Dwivedi *et al.*, 1998) protegendo internamente e externamente de espécies reativas de oxigênio geradas ou de radicais. Esse mecanismo de defesa é dividido em duas fases. Na primeira fase, destacam-se as reações capazes de acrescentar um grupamento substituto adequado ao composto. A segunda fase envolve biossíntese do agente tóxico e sua ligação com algum componente do tecido normal ou do substrato endógeno (Nascimento, 2008; Stegeman *et al.*, 2010). A toxicidade ocorre quando há interação entre agente tóxico e os constituintes bioquímicos das células de um organismo; principalmente nos sistemas enzimáticos, que são capazes de detectar, responder e metabolizar agentes tóxicos (Lewis, 1996). Logo, alterações nestes sistemas de enzimas que metabolizam agentes tóxicos podem se tornar uma resposta induzida por poluentes ambientais. Nesse sentido tanto o sistema do *citocromo P450IA1 (cyp1a1)* como o gene *metalotioneína (mt)* tem sido particularmente bem estudados (Goksøyr e Förlin, 1992; Leaver, 1996; Chan *et al.*, 2006).

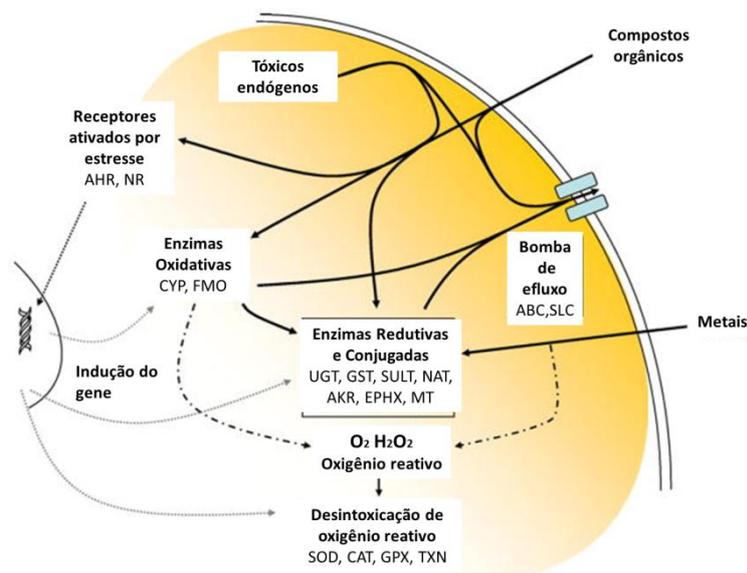


Figura 2 - Defesa química celular. Biotransformações de substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas. Linhas sólidas indicam caminhos possíveis para substâncias tóxicas exógenas; linhas pontilhadas representam possíveis induções de genes em resposta a receptores de estresse-ativados; linhas tracejadas com pontos indicam possíveis fontes de produção endógena estimulada por substâncias tóxicas de oxigênio reativo. Fonte: modificado de Goldstone *et al.* (2006).

Os citocromos P450 constituem uma superfamília de enzimas heme-tiolato que são onipresentes na natureza (Lewis, 1996), sendo encontrados em todos os reinos biológicos, com exceção de algum Archaea (Poulos, 2005). Processos evolutivos permitiram que a estrutura P450 fosse selecionada para se ligar a diferentes moléculas, como oxigênio, substratos à base de carbono, um grupo heme e parceiros redox, como redoxina ferro-enxofre, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase dependente (NADPH-dependente), dinucleótido de flavina e adenina (FAD-) e mononucleótido de flavina (FMN-) contendo redutase de flavoproteína e citocromo b₅ (Gibson e Skett, 2001; De Montellano, 2005). Essa capacidade de se ligar e metabolizar um grande número de substratos de diversas classes químicas é uma característica fundamental da atividade P450. No entanto, esta funcionalidade depende muito da enzima de interesse (Rendic e Di Carlo, 1997; Rendic, 2002). Basicamente, a ligação e a seletividade de substratos P450 estão ambos relacionados às características particulares da região do sítio ativo da enzima (Lewis, 2000). A grande maioria das enzimas capazes de metabolizar HPAs são membros da família 1, por exemplo, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. Existem vários estudos comparando metabolismo e ativação mutagênica de compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) por essas três enzimas (Bolt, 2008).

No caso do gene *cyp1a1*, sua indução é provocada por HPAs e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos halogenados (HPAH). A entrada desses compostos nas células acontece por difusão passiva e se ligam especificamente ao receptor de Ah (*Arylhydrocarbon*); formado por um complexo de proteínas citosólicas (Gelboin, 1980; Whitlock, 1990). Esta ligação permite a dissociação de hsp90, uma proteína de 90 kD presente em células normais, deixando o receptor de Ah livre para dimerizar com a proteína ARNT (*Ah receptor nuclear translocator*). O complexo dimerizado e ativado entra no núcleo da célula e interage diretamente com seu gene alvo contendo uma sequência regulatória específica na qual o complexo se liga (FIGURA 3). A ligação do complexo ativado para as regiões de regulação destes genes resulta em uma modulação da sua transcrição, consequentemente, causando alterações nos níveis de produtos proteicos destes genes (Swanson e Bradfield, 1993).

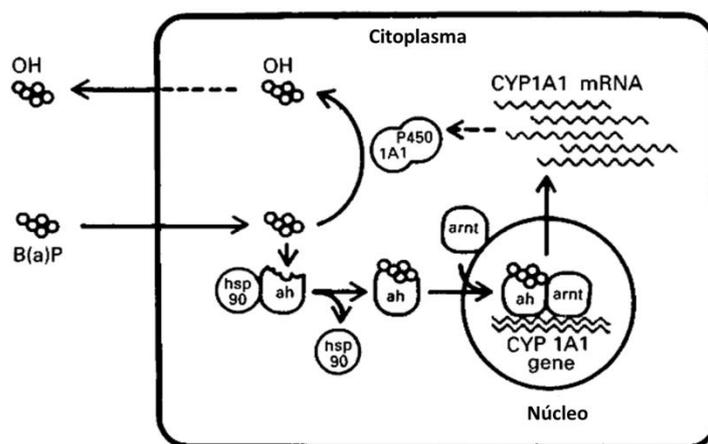


Figura 3 - Representação esquemática da ativação do receptor de Ah e expressão do gene citocromo P450 1A1 por benzo(a)pireno. Fonte: modificado de Leaver (1996).

Em relação as proteínas de metalotioneína (MT), que tem demonstrado estrutura e função homóloga entre os mamíferos (Hamer, 1986), as principais características descritas são baixo peso molecular; alto teor de cisteína e escassez de resíduos aromáticos e hidrofóbicos de aminoácidos; alto teor de grupos tiol eficazes nas ligações com íons de metais pesados. Na fisiologia do organismo, a MT desempenha um papel importante no sequestro, desintoxicação de metais pesados (Chan *et al.*, 2006) e na regulação de metais essenciais como o zinco durante o desenvolvimento embrionário de peixes (Olsson *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2004). Além disso, a MT também desempenha outros papéis como transporte de íons metálicos, eliminação de radicais livres, armazenamento de íons metálicos (Zn, Cd, Cu, e Hg), metabolismo de íons metálicos

essenciais, resposta imune (atua como um doador de Zn), genotoxicidade e carcinogenicidade (Nordberg e Nordberg, 2009). A atuação dessa proteína pode ser exemplificada com a absorção do cádmio (Cd) em seres humanos e outros animais (Nordberg e Nishiyama, 1972; Nordberg e Nordberg, 2000). Após a absorção do Cd pelos pulmões ou intestinos, o Cd é transportado pelo sangue para outras partes do corpo. No sangue, o Cd está ligado as células sanguíneas (Jarup *et al.*, 1983), onde frações de alto e baixo peso moleculares ocorrem (Nordberg *et al.*, 1971). Alguns estudos (Nordberg, 1978; Garty *et al.*, 1981) indicam que frações de baixo peso molecular são similares a MT, no qual também liga Cd ao plasma (Nordberg *et al.*, 1971). O baixo peso molecular da MT permite que esta proteína seja filtrada através das membranas glomerulares dos rins. Consequentemente, a MT é reabsorvida nas células tubulares proximais igualmente a outras proteínas. O transporte de Cd ligado a MT do sangue para as células do túbulo renal é rápido e quase completo (Nordberg e Nordberg, 1975; Johnson e Foulkes, 1980). A capacidade de MT ligar-se a metais vai variar de acordo com a afinidade pelo metal (Kagi, 1991). No total são conhecidos 18 metais diferentes capazes de ligar-se a MTs, dentre eles o Cu, Cd, Ag, Hg, Bi, Pb e Zn. (Nath *et al.*, 1988; Coyle *et al.*, 2002). Em vertebrados existem quatro tipos de metalotioneínas, MT-1 a MT-4 (Kagi, 1991; Coyle *et al.*, 2002). As MTs são encontradas principalmente no citoplasma, entretanto, sob condições de estresse causado por radiação ultravioleta, elas podem se mover para o núcleo onde atuam na ativação de fatores de transcrição contendo dedo-de-zinco¹, promovendo o intercâmbio de Zn (Takahashi *et al.*, 2005). Os genes *mt-1* e *mt-2* são expressos em todas as fases do desenvolvimento da maioria dos tipos de células e funcionam como um reservatório de Zn. O gene *mt-2* também tem demonstrado ser um gene neuroprotetor na isquemia cerebral (Durnam e Palmiter, 1987; Penkowa *et al.*, 2002). Em *Danio rerio*, Chen *et al.* (2004) registraram a expressão do gene *metalotioneína* (*mt*) em vários estágios embrionários (desde a primeira célula até o quarto dia de desenvolvimento), indicando que embriões de *D. rerio* são modelos em potencial para ensaios de toxicidade aguda para avaliar ambientes aquáticos poluídos com metais pesados. Assim, selecionamos o gene *mt2* como biomarcador para avaliar possíveis efeitos causados por agentes tóxicos de metais pesados neste estudo.

¹ Dedo de zinco ou *zinc finger*: são segmentos estruturais que fazem parte do domínio de ligação ao DNA. São formados por quatro resíduos de cisteína em cada dedo e configuram complexos coordenados por íons de zinco, formando duas estruturas independentes em forma de alça.

Toxicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

Os compostos HPA são agentes tóxicos orgânicos, derivados principalmente da queima de combustíveis fósseis e da mistura de alguns solventes (Teaf, 2003). Suas características químicas assumem propriedades apolares e lipossolúveis e podem ser consideradas carcinogênicas (Nelson-Smith, 1971; Boffetta *et al.*, 1997). As incorporações de alguns HPA em organismos vertebrados aquáticos, como os peixes, podem ocorrer inicialmente nos tecidos das brânquias, do fígado e intestino (Lee *et al.*, 1972). Nesses tecidos, o mecanismo de toxicidade interfere na função da membrana celular e de sistemas enzimáticos associados (Neff, 1985). Entretanto, preocupações maiores que HPA não metabolizados pelo organismo, encontram-se na habilidade de metabólitos reativos de alguns HPA, como epóxidos e dihidrodíols, em ligar-se a proteínas celulares e DNA. Essas alterações bioquímicas e alterações das funções e estruturas celulares promovem mutações, má-formações durante o desenvolvimento, tumores, alterações na reprodução, redução do crescimento, alterações no DNA, alterações no sistema imunológico, alterações nas funções endócrinas, alterações no comportamento, doenças no sangue, no fígado e rins, alterações na respiração e na frequência cardíaca, hiperplasia nas brânquias, erosão das nadadeiras e morte (Eisler, 2000; Albers, 2003). Estudos relacionados aos efeitos provocados pela exposição de embriões de peixe-zebra a compostos de HPA e seus derivados identificaram efeitos tais como: disfunção cardíaca, edemas no pericárdio e no saco vitelínico, curvatura da coluna vertebral, redução do tamanho do maxilar e de outras estruturas craniofaciais (Incardona *et al.*, 2004).

Embora ainda não se tenha conhecimento de exatamente como acontecem essas alterações morfológicas, alguns estudos indicam caminhos que tentam explicar sua ocorrência. Um exemplo disso é o processo de desenvolvimento de edemas cardíacos nos embriões de *Danio rerio*. Alguns estudos sugerem que a formação dessa anomalia está associada a falhas no sistema cardíaco (Lanham *et al.*, 2014) e que a formação de edema pode provocar alterações na morfologia dos rins, apesar de não alterar o processo de filtração; e ainda substâncias como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) que podem inibir a função da barreira de permeabilidade da água, crítica para a manutenção do balanço osmótico no desenvolvimento inicial (Hill *et al.*, 2004). Devido aos peixes de água doce serem hiperosmótico e habitarem ambientes com baixa osmolaridade, estes acabaram desenvolvendo muito bem a habilidade de excluir água (Bradley, 2009).

Essa habilidade é dependente das funções realizadas pela pele, brânquias e rins, que garantem a manutenção do volume e osmolaridade do organismo. A pele forma uma barreira para a entrada de água, e os rins excretam constantemente todo excesso de água que ultrapassa essa barreira (Serluca *et al.*, 2002). Nos embriões de peixes, entre o período de 48 a 72 horas pós-fertilização (hpf), o desenvolvimento de brânquias e do sistema digestivo propiciam áreas de intensa permeabilidade (Kimmel *et al.*, 1995). Entretanto, o desenvolvimento das brânquias em peixe-zebra só está completo ao término de duas semanas pós-fertilização e sua função primária inicial pode ser a regulação de íons ao invés de troca gasosa (Pelster e Bagatto, 2010). Em relação ao trato digestivo, o mesmo se encontra completo 5 dias pós-fertilização e passa a ser usado após todo o vitelo ter sido consumido pela larva (Wallace e Pack, 2003).

No que se refere à toxicidade originada por agentes tóxicos, uma possibilidade é que compostos que se ligam ao receptor aryl hydrocarbon (AHR), como por exemplo, o TCDD (Hill *et al.*, 2004) e alguns membros dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos halogenados (HPAH) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Incardona *et al.*, 2004), são capazes de provocar perturbações na manutenção dessa barreira que impede a difusão de água para dentro do organismo (Guiney *et al.*, 2000). Na tentativa de explicar como isso acontece, Hill *et al.* (2004) realizaram experimentos tentando identificar se o TCDD causava alguma alteração no desenvolvimento dos rins, na expressão dos genes reguladores essenciais (*sim 1*, *pax 2a*, *wt 1*) e da sua função. Entretanto, os resultados para todos esses ensaios foram negativos. A única alteração detectada foi na área glomerular, em que a altura média de cada glomérulo foi reduzida. Em adição, houve redução na área do espaço de Bowman, como se a pressão crescente da formação de edema pudesse causar achatamento do glomérulo. Por outro lado, a utilização de manitol, uma substância capaz de remover a força osmótica que conduz a água para dentro dos peixes, ocasionou o bloqueio com sucesso sobre a formação do edema induzido por exposição ao TCDD. Hill *et al.* (2004) concluem que existe um efeito de TCDD sobre a permeabilidade da água, mas que há a possibilidade de que a mudança na morfologia renal seja secundária ao edema. O edema também pode produzir efeitos negativos no sistema circulatório ocasionando a diminuição da filtração glomerular e aumento do edema.

Desta forma, Lanham *et al.* (2014) para entender como a toxicidade do TCDD afeta o sistema cardíaco, construíram um receptor AHR constitutivamente ativo

(caAHR) baseado no AHR2 presente em *Danio rerio* e expresso especificamente em cardiomiócitos. Os resultados mostraram que a ativação de caAHR nos cardiomiócitos foi a responsável pela má formação cardíaca, perda de circulação e edema no pericárdio.

Há fortes indicações de que compostos químicos como HPAs e HPAHs promovem falhas no sistema circulatório, que conseqüentemente induzem anormalidades no funcionamento do sistema renal, principalmente no que se refere ao controle osmótico do organismo. Assim, as formações de edemas no pericárdio e no saco vitelínico acabam se tornando características visíveis quando o organismo está exposto a tais substâncias (Hill *et al.*, 2004; Lanham *et al.*, 2014).

Toxicidade dos metais

A definição de metal é um tanto ampla e imprecisa. Uma das definições diz que metal é: "*Qualquer um de uma categoria de elementos eletropositivos que normalmente têm uma superfície brilhante, geralmente são bons condutores de calor e eletricidade, e podem ser derretidos ou fundidos, martelados em folhas finas, ou transformados em fios. Metais típicos formam sais com não-metais, óxidos básicos com oxigênio, e ligas com outros metais.*" (Soukhanov *et al.*, 1992) Entretanto, existem exceções nesta definição. Contudo, a grande questão é que todos os seres vivos estão continuamente em contato com metais, mesmo antes da idade industrial. Por exemplo, na água que bebemos existem minerais e traços de inúmeros metais; outro exemplo, as plantas absorvem metais do solo, e quando ingerimos plantas, algumas frações desses metais são absorvidas por nosso trato digestivo. Porém, a quantidade absorvida nesses dois exemplos não é o bastante para causar toxicidade (Hook, 2008).

No meio ambiente encontramos dois tipos de metais: os essenciais e os não-essenciais. Os metais essenciais (exemplos: Na, K, Ca, Mg, Fe, Cr, Zn, Co, Mn, Ni) auxiliam o funcionamento fisiológico dos seres vivos e os metais não essenciais (exemplos: As, Pb, Cd, Hg, Al, Ti, Sn, W) não são necessários em nenhuma via metabólica. Para ambos os tipos de metais, a interação com os seres vivos pode ocasionar alterações fisiológicas sérias. Todos os aspectos dependerão da frequência, magnitude, duração da exposição, todas que excedem o limite de tolerância no organismo (Donkin *et al.*, 2003). Em peixes, uma das formas de captação de metais ocorre através das células epiteliais nas brânquias. Nas células os metais são absorvidos através da bomba de sódio (Na) e cálcio (Ca), pelo cotransportador de

sódio/potássio/cloreto, ou pelo permutador de sódio/próton. Embora esses transportadores sejam mais comuns e presentes em muitas células, existem pequenos números de carregadores para íons (Nikinmaa, 2014). A acumulação de metais no corpo de peixes pode ser diferente para cada metal. Em resposta a uma exposição crônica, pequenas concentrações de Zn foram observadas nas brânquias e no restante do corpo do peixe rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), enquanto o Cu foi acumulado no fígado e o Cd nos rins (McGeer *et al.*, 2000). Sendo assim, a toxicidade dos metais pode intervir em vários mecanismos fisiológicos nos peixes, principalmente os que estão relacionados à captação de Ca^{2+} , Na^{+} e homeostases (Hogstrand *et al.*, 1996; Niyogi e Wood, 2004). Metais como o níquel também afetam a respiração (Pane *et al.*, 2003). Nos embriões de peixes, a toxicidade dos metais podem provocar atrasos na eclosão (Dave and Xiu 1991), má-formações durante a organogênese, anomalias craniofaciais, má-formação do saco vitelínico, encurtamento e curvatura vertebral, má formação cardíaca, danos nos vasos sanguíneos e hemorragias (Jeziarska *et al.*, 2009; Witeska *et al.*, 2014).

Tendo em vista que até recentemente o esgoto da cidade de Macaé não possuía qualquer tratamento, as chances de canais lançando efluentes em corpos d'água com agentes tóxicos se tornou uma possibilidade.

Macaé – “capital do petróleo”

A cidade de Macaé nas últimas décadas experimentou um crescimento econômico altíssimo ocasionado pela rápida instalação e consolidação de setores voltados à produção e serviços para as atividades de exploração de petróleo e gás natural na Bacia de Campos (Dias, 2013). Esse crescimento econômico veio acompanhado do crescimento urbano desordenado (FIGURA 4). A comparação entre os Censos Demográficos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) nos anos 2000 e 2010 indicam que a população residente cresceu de forma pronunciada no município e alguns bairros duplicaram de tamanho (TABELA 2).

Associado ao crescimento urbano houve também o aumento do lançamento de efluentes sem tratamento em corpos d'água pela cidade. Dentre os ecossistemas afetados temos a lagoa Imboassica e o canal Macaé-Campos.

Lagoa Imboassica

Sendo uma lagoa costeira, a lagoa Imboassica foi formada a partir de sedimentação da foz do rio Imboassica que drenava para o oceano (Esteves, 1998). As características físicas da lagoa indicam que a mesma possui uma profundidade média de 1,5m, temperatura de 24,6°C, pH de 8,1, condutividade 4,9 mS/cm, salinidade de 2,7 ppt, transparência 1,3m e oxigênio dissolvido 9,1 mg/L (Petruccio, 1998). Em relação à biota, a lagoa abriga organismos que variam desde invertebrados até peixes (Esteves, 1998).

A lagoa Imboassica já representou uma fonte importante de produção de pescado para o município de Macaé, assim como, atualmente serve a população nas formas de recreação e turismo. Porém, já há alguns anos, a lagoa vem sofrendo impactos agressivos e irreversíveis a curto prazo. Desde 1960, dos impactos observados temos: lançamentos de efluentes domésticos e/ou industriais, aterro das margens, assoreamento da bacia, retirada de areia e depósitos calcários, degradação da vegetação terrestre no entorno da lagoa costeira ou ao longo de seus tributários, introdução de peixes exóticos (como Tilápia) e edificações nas margens (Esteves, 1998).

Tais alterações, principalmente as de cunho ecológicos, vêm sendo estudadas ao longo dos anos na lagoa Imboassica. Dentre esses estudos, Machado (2012) realizou análise da qualidade da água e do sedimento aquático próximo aos principais afluentes (canais e rios) da lagoa quantificando a concentração de metais como As, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Ni e Zn. Os resultados mostraram altos valores de chumbo e mercúrio no rio Imboassica. Machado (2012) destaca ainda a concentração de As encontrada no canal localizado no bairro Novo Cavaleiros, que mesmo abaixo do limite, precisa ser avaliado com novas abordagens. Outro estudo realizado na lagoa Imboassica, dessa vez por Coimbra (2013), quantificou a concentração de metais (Cd, Pb, Cr e Ni) em tecidos musculares da espécie *Hoplias malabaricus*. O resultado observado registrou valores abaixo do limite estipulado pela legislação brasileira – Decreto nº 55.871, de 26/03/65 do Ministério da Saúde e da portaria nº 685 de 27/08/1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entretanto, Coimbra (2013) identificou, através do uso de biomarcadores, que a espécie de peixe *Hoplias malabaricus* apresentou diminuição da atividade total da enzima acetilcolinesterase. Ainda de acordo com o autor, a acetilcolinesterase é um reconhecido biomarcador neurotóxico, sendo inibida principalmente por organofosforados e carbamatos.

Esses resultados indicam a presença de substâncias com potencial tóxico nos efluentes que são lançados na lagoa e que estes agentes tóxicos estão interagindo com os organismos alterando alguns processos metabólicos. Desta forma, surgem preocupações, pois mesmo a lagoa Imboassica estando imprópria para banho, a mesma tem sido utilizada nos fins de semana por adultos e crianças para o lazer, aumentando assim a chance de contaminação da população por agentes tóxicos ou patogênicos.

Canal Macaé-Campos

Em relação ao canal Macaé-Campos, Soffiati (2007) aponta sua importância na sua história. O autor conta que o canal foi construído por mão-de-obra escrava com o objetivo de escoar a produção agrícola entre as cidades de Macaé e Campos dos Goytacazes. Foi idealizado em 1837 pelo inglês John Henrique Freese, sua construção deu início no ano de 1844 e a inauguração ocorreu em 1861. Este canal conectava o rio Macaé ao rio Paraíba do Sul, com extensão de aproximadamente 100 km. Considerado o segundo maior canal do mundo. Soffiati (2007) ainda diz que no ano de 2002, o Canal Macaé-Campos foi tombado oficialmente pelo Instituto Estadual do Patrimônio Cultural mediante Edital publicado. Entretanto, atualmente o valor atribuído pela população e autoridades ao canal tem sido de depósito de efluentes domésticos e industriais. Existe uma prática na cidade que já se tornou alvo de notícias em jornais locais (InterTV, 2013), da ação de alguns caminhões coletores de efluentes fazendo o descarte em corpos d'água da cidade (FIGURA 5).

Além disso, devido ao canal Macaé-Campos estar conectado ao rio Macaé, o canal sofre influência dos períodos de cheia e vazante promovidos pelo efeito de maré. Processo que permite a “renovação” de grande volume de água do canal que se mistura as águas do rio Macaé. Alguns trabalhos apontam que no estuário do rio Macaé, próximo ao local onde o canal se conecta, as emissões antrópicas de nutrientes (N, P) e metais (Zn, Cd, Cu e Pb) superam as naturais (Molisani *et al.*, 2013). De acordo com Molisani *et al.* (2013) as principais fontes desses poluentes estão nos descartes de efluentes domésticos e da pecuária, com exceção do Pb que tem sua fonte na disposição de rejeitos sólidos. Os autores ainda atribuem esses impactos ao crescimento urbano e socioeconômico causado pela estimulação das atividades promovidas do setor petrolífero.

Embora existam inúmeros outros pontos de lançamento de efluentes espalhados pela cidade de Macaé, escolhemos a lagoa Imboassica e o canal Macaé-Campos devido ao fácil acesso de coleta de material e pela possibilidade de haver descarte irregular de resíduos por empresas nesses locais.



Figura 4 – Lagoa de Imboassica em fevereiro de 2010 (A), fevereiro de 2013 (B) e outubro de 2014 (C). Dados do IBGE indicam que o crescimento urbano no entorno da lagoa duplicou de tamanho. A seta em vermelho indica o local onde foi realizado a coleta de efluentes.



Figura 5 – (A) Local de coleta da amostra de efluentes que desembocam no Canal Macaé-Campos (círculo vermelho). (B) As amostras são coletadas antes de se diluírem na saída da manilha que conduz o efluente até o canal. (C-D) Em frente ao ponto de coleta existe um terreno com reservatórios de efluentes trazidos por caminhões coletores. Esses efluentes desembocam no canal sem tratamento prévio.

Tabela 2 – Dados do IBGE indicam que o número de pessoas residentes em alguns bairros do município duplicaram de tamanho.

	Censo Demográfico da cidade de Macaé		
	2000	2010	% Crescimento
TOTAL	132 461	206 728	56,1
Bairros no entorno da lagoa Imboassica			
Cavaleiros	2 406	2 551	6,0
Glória	2 982	6 194	107,7
Granja dos Cavaleiros	2 281	5 056	121,7
Imboassica	991	1 035	4,4
Lagoa	2 129	5 102	139,7
Vale Encantado	74	194	162,2
Bairros no entorno do canal Macaé-Campos			
Parque Aeroporto	16 992	25 657	51,0
São José do Barreto	1 106	2 300	108,0

Objetivo

Analisar o efeito tóxico de efluentes lançados na Lagoa de Imboassica e no canal Macaé-Campos, em embriões de *Danio rerio*, considerando a letalidade e os efeitos morfológicos em doses subletais, avaliando detalhadamente as alterações no desenvolvimento embrionário causadas por substâncias encontradas nos efluentes por meio da mudança na expressão de biomarcadores.

Materiais e Métodos

Manutenção dos reprodutores

Os organismos adultos de *Danio rerio* sexualmente maduros foram mantidos em aquários de 30 litros com sistema contínuo de filtração, garantindo níveis de amônia, nitrito e nitrato em condições ideais. A oxigenação foi mantida garantindo valores >6mg/L. O pH foi checado constantemente com o objetivo de mantê-lo sempre próximo a 7.0. A temperatura foi mantida em $28^{\circ} \pm 1$. Todos os indivíduos usados como matrizes foram aclimatados a um sistema de claro/escuro de 14h/10h. A alimentação diária consistiu em duas porções de ração comercial em flocos BASIC da empresa ALCON, complementada uma vez com náuplios de artemias; nos finais de semana, a alimentação foi feita com náuplios de artemias e uma vez com flocos (Schulte, 1994; Westerfield, 1995; Lammer *et al.*, 2009).

Produção de ovos

No dia anterior ao início do experimento, ao final da tarde, foram postos tanques de desova (tamanho: 12 cm de altura X 17 cm de comprimento X 1,13 cm de largura) dentro dos aquários das matrizes. Dentro dos tanques de desova, utilizamos pedras (tipo: areia de quartzo; tamanho: 5-8 mm) como aparato estimulante; as pedras usadas são comumente comercializadas como ornamentação para aquários. A razão entre machos e fêmeas nas matrizes foi 2:1. O acasalamento e a desova aconteceram no dia seguinte durante os primeiros 30 minutos após iniciar o ciclo do período claro. Em seguida, os tanques foram retirados e a água contida dentro deles foi filtrada, aglomerando os ovos, que imediatamente foram levados para o laboratório para serem observados, sob um microscópio estereoscópico. Somente foram utilizados para experimentos os ovos fertilizados (FIGURA 1). Após a separação dos ovos fertilizados dos não-fertilizados, os experimentos foram iniciados (Lammer *et al.*, 2009; Selderslaghs *et al.*, 2009; Jeffries *et al.*, 2014).

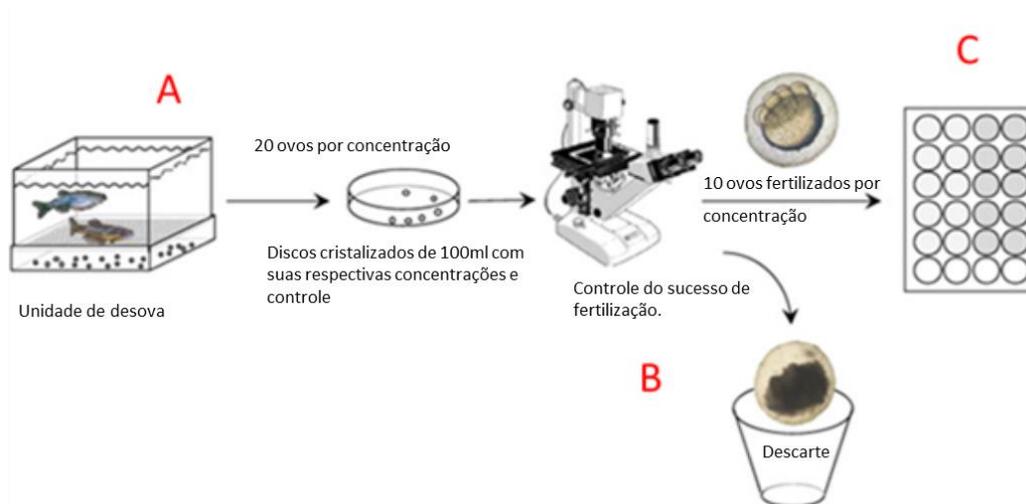


Figura 6 - Esquema dos processos de realização do ensaio de toxicidade utilizando embriões de *Danio rerio*. Da esquerda para a direita: coleta dos ovos (A), separação entre fertilizados e não-fertilizados (B), e distribuição de ovos fertilizados nas placas de 24 poços contendo as soluções testes (C). FONTE: adaptado de Lammer *et al.* (2009), p. 198.

Água de diluição

A água de diluição utilizada nos ensaios seguiu o protocolo do meio de embrião (E3). O meio de embrião foi preparado com 5mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM MgSO₄, 10⁻⁵% azul de metileno, disponível em Nüsslein-Volhard (2002).

Coleta e caracterização físico-química das amostras de efluentes

As amostras de efluentes foram coletadas e preservadas seguindo a ABNT (2007). Os efluentes foram coletados diretamente da origem de despejo; garantindo que a concentração do efluente não fosse diluída pela água do canal e nem pela água da lagoa. As manipulações das diferentes diluições para os ensaios de toxicidade ocorreram no Laboratório Integrado de Ciências Morfofuncionais (LICM). A coleta de efluente foi realizada com volume total de 8 litros. Do volume total, 4 litros foram encaminhados ao laboratório de espectrometria atômica (Labspectro) no Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. A amostra foi mantida em temperatura menor que 10°C sem congelamento. O serviço prestado foi de identificação e quantificação de metais pesados.

Assim que as amostras chegavam ao laboratório (LICM), imediatamente iniciava-se a caracterização físico-química da água, seguindo a ABNT (2007). As medições foram feitas dos seguintes fatores abióticos: temperatura (Oxímetro YSI 550A), salinidade (Termosalinômetro YSI yellow spring; Modelo: YSI85), condutividade (Termosalinômetro YSI yellow spring; Modelo: YSI85), oxigênio

dissolvido (Oxímetro YSI 550A), pH (pHmetro modelo PHS-3B - PHtek), amônia (Labcon Test Amônia Tóxica Água Doce - Alcon), nitrito (Labcon Test Nitrito - Alcon) e dureza total (Labcon Test Dureza Total Gh - Alcon).

Teste de toxicidade com embriões de peixes

Os testes foram realizados seguindo duas metodologias. A primeira segue o modelo proposto por Lammer *et al.* (2009). Dez poços de uma placa de vinte e quatro foram designados para cada nível do tratamento e o controle negativo (FIGURA 2). Em cada poço foram pipetados dois mililitros de solução e dez ovos fertilizados. As possíveis alterações morfológicas foram registradas com 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização (hpf).

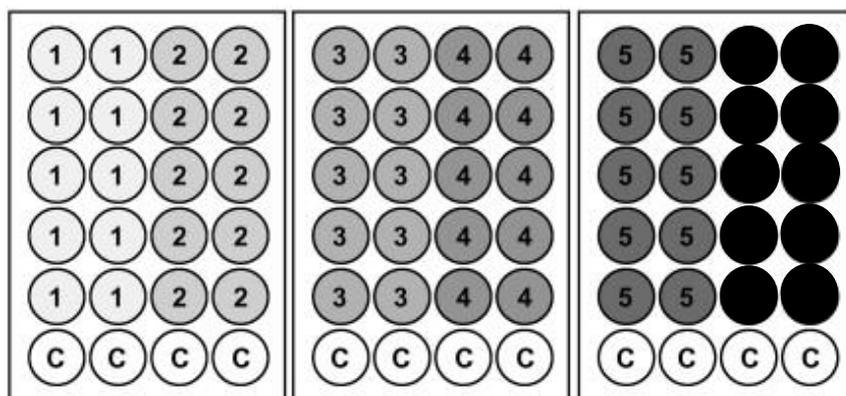


Figura 7 – Esquema da distribuição dos testes de concentração e controle negativo. O controle negativo (C, contendo o meio de embrião E3) é igualmente distribuído nas placas do experimento a fim de identificar peculiaridades específicas das placas. No esquema acima, os poços em cor preta e sem numeração não são utilizados. FONTE: adaptado de Lammer *et al.* (2009), p. 199.

No caso de amostras de efluentes com oxigenações menores do que 4 mg/L, seguiu-se a metodologia proposta pela OECD (2013). Vinte poços de uma placa de vinte e quatro foram separados para cada tratamento. Os quatro poços restantes eram usados como controle negativo interno da placa. O controle negativo também foi preparado numa placa separada, sendo utilizados os vinte e quatro poços. Em cada poço foi pipetado dois mililitros de solução e um ovo fertilizado. As alterações morfológicas foram registradas com 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização.

Coleta e diluição dos efluentes

Canal Macaé-Campos

A primeira coleta de efluente foi realizada dia 02/04/2014 e este foi mantido em temperatura menor que 10°C sem congelamento. Os experimentos não foram iniciados imediatamente devido as matrizes de *Danio rerio* não terem produzido quantidade de ovos fertilizados suficientes. Sendo assim, o primeiro experimento aconteceu no dia 10/04/2014; o segundo experimento, dia 08/05/2014; e por fim, o terceiro experimento no dia 22/05/2014. Os ensaios foram preparados com as seguintes diluições: C80 (80% de efluente somado a 20% de E3), C60 (60% de efluente somado a 40% de E3), C40 (40% de efluente somado a 60% de E3) e por fim o controle negativo (CTRL, contendo somente E3). Os experimentos foram feitos seguindo a metodologia proposta por Lammer *et al.* (2009). Ao término das 96 horas de exposição dos embriões ao efluente, os embriões foram colocados em TRIzolReagent (Life Technologies) para posterior extração de RNA.

A repetição da amostragem aconteceu com uma segunda coleta de efluente realizada no dia 15/10/2014 e mantida a temperatura menor que 10°C sem congelamento. Entretanto, devido aos resultados obtidos das características físico-químicas, foram realizados três experimentos usando o efluente: primeiro (25/10/2014), com as mesmas condições que foram coletadas; o segundo (04/11/2014) com o efluente aerado; e o terceiro (11/11/2014), com o efluente filtrado (filtro para seringa de 0,22 micrômetros - KASVI). As diluições foram realizadas com volumes diferentes da amostra do mês de abril, sendo eles, C20 (20% de efluente somado a 80% de E3), C30 (30% de efluente somado a 70% de E3), C40 (40% de efluente somado a 60% de E3), C60 (60% de efluente somado a 40% de E3) e por fim o controle negativo (CTRL, contendo somente E3). Os experimentos foram feitos seguindo a metodologia proposta pela OECD (2013). Ao término das 96 horas de exposição dos embriões ao efluente, os embriões foram colocados em TRIzolReagent (Life Technologies) para posterior extração de RNA.

Lagoa Imboassica

A coleta de efluente foi realizada dia 15/07/2014 e este foi mantido em temperatura menor que 10°C sem congelamento. Os experimentos não iniciaram imediatamente devido as matrizes de *Danio rerio* não terem produzido quantidade de

ovos fertilizados suficientes. Sendo assim, o experimento aconteceu no dia 22/07/2014. Para a realização dos ensaios, o efluente foi aerado até alcançar 5mg/L de oxigênio dissolvido. Em seguida, os ensaios foram preparados com as seguintes diluições: C80 (80% de efluente somado a 20% de E3), C60 (60% de efluente somado a 40% de E3), C40 (40% de efluente somado a 60% de E3) e por fim o controle negativo (CTRL, contendo somente E3). Os experimentos foram feitos seguindo a metodologia proposta pela OECD (2013). Ao término das 96 horas de exposição dos embriões ao efluente, os embriões foram colocados em TRIzolReagent (Life Technologies) para posterior extração de RNA.

Preparação das amostras para o teste de toxicidade utilizando biomarcadores

Desenho dos *primers*

Ambos os genes *cyp1a1* e *mt* foram selecionados neste trabalho com o objetivo de identificar se existem concentrações suficientes de HPA e metais pesados nas amostras de águas coletadas para causar alterações em suas expressões. Para conseguir esses dados, os *primers* foram desenhados de acordo com a TABELA 3. O gene β -actina foi utilizado como gene constitutivo ou referência para a normalização dos resultados da expressão gênica alcançados com a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT-PCR) em tempo real (Tang *et al.*, 2007). Genes constitutivos ou de referência são aqueles cujos produtos estão envolvidos em funções de manutenção celular biológica básica e transcritos a uma taxa relativamente estável em muitos diferentes tipos de células e condições (Casadei *et al.*, 2011).

Tabela 3 - As sequencias dos *primers* foram retiradas de Liedtke *et al.* (2008).

Gene	Genbank No.	Primers
<i>β-actin</i>	AF057040	Forward AGGTCATCACCATTGGCAAT exon 1 Reverse GATGTCCACGTCGCACTTCAT exon 2
<i>mt2</i>	AY305851	Forward TGTGCCAAGACTGGAAGTTG exon 1 + 2 Reverse AGCTGGAGCCACAGGAATT exon 3
<i>cyp1a1</i>	AB078927	Forward CCTGGGCGGTTGTCTATCTA exon 4 Reverse AGGTTGCGCCTGTCAGATAA exon 5

Extração de RNA

Seguindo o protocolo da empresa, os embriões eram colocados em tubos eppendorfs ao término dos experimentos com 1 ml de TRIzolReagent (Life

Technologies). Em seguida, os embriões foram macerados com pistilos no próprio tubo eppendorf por 2 minutos. Após a maceração, os tubos foram centrifugados (ThermoFisher Scientific – modelo: Heraeus Fresco 17) a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, com a intenção de separar e fazer o descarte da camada de gordura e outros materiais insolúveis das amostras. Ao término da centrifugação, a solução sobrenadante foi transferida para novos tubos eppendorfs. Em seguida, a fase de separação foi iniciada com a adição de 0,2 ml de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Os tubos contendo as amostras foram levados à centrífuga novamente a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi removida e transferida a novos tubos *eppendorfs* enquanto a fase orgânica foi descartada.

Para iniciar o procedimento de isolamento de RNA foram adicionados 0,5 ml de isopropanol 100% a fase aquosa e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a velocidade de 12.000 x g a 4°C.

Ao término desta última centrifugação, houve a formação de um *pellet* de RNA. Então, foi removida a solução flutuante e adicionado 1 ml de etanol 75% em água livre de DNase/RNase para a lavagem do RNA. Em seguida, as amostras foram levadas brevemente ao *Vórtex-Mixer* (KASVI basic – K45-2820) por 5 segundos e por fim centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. A solução usada na lavagem foi descartada e o *pellet* de RNA foi deixado secar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida o RNA foi ressuspenso em 30µl de água livre de RNase e DNase e incubada em bloco de calor a 55°C por 10 minutos. Ao término, as amostras de RNA foram guardadas em refrigeração a -70°C para posterior utilização.

Antes de iniciar a síntese de DNA complementar (cDNA), as concentrações das amostras de RNA e a relação 260/280 foram medidas com o uso do aparelho Thermo Scientific NanoDrop ND2000, utilizando 1 µl de RNA. Esses valores foram usados para determinar os volumes de RNA necessários para 2µg a serem utilizados na síntese de cDNA.

Síntese do DNA complementar (ou cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo oferecido pela empresa com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). O mastermix do *kit* foi preparado contendo 2µl de 10x RT Buffer, 0.8µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2µl de 10x RT Random Primers, 1µl de MultiScribe Reverse Transcriptase, 4.2 de Nuclease-free H₂O, totalizando 10µl de mix a ser usado para cada amostra.

Em seguida, foram pipetados 10µl de 2x RT mastermix em tubos eppendorfs individuais acrescentados de 10µl de amostra contendo 2 microgramas de RNA, separadamente. As soluções foram homogeneizadas utilizando o Vórtex-Mixer (KASVI basic – K45-2820) durante 5 segundos. Os tubos foram vedados e rapidamente centrifugados (5 segundos) em centrífuga de bancada para aglomerar a solução preparada no final do tubo e evitar a formação de bolhas de ar. Todos esses passos foram manipulados com as amostras e o *kit* sempre em contato com gelo até chegar ao termociclador (Applied Biosystems – Modelo: 9902; Veriti™ 96-Well Thermal Cycler).

O termociclador foi configurado em 4 passos com temperaturas e tempos diferentes um do outro (TABELA 4): (1 passo: anelamento dos primers; 2 passo: transcrição reversa; 3 passo: desnaturação do RNA; 4 passo: manutenção em baixa temperatura).

Tabela 4 - Configuração do termociclador para a síntese de cDNA.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

O volume final da reação foi de 20µl. Ao finalizar, as amostras de cDNA foram guardadas a refrigeração de -20°C.

Reação em cadeia da polimerase “quantitativo em tempo real” (qRT-PCR em tempo real)

As quantificações da expressão gênica de *cyp11a1*, *mte* β-actina foram realizadas utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life – AppliedBiosystems). Este kit contém o corante SYBR® Green I, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs e componentes de buffer otimizados.

A montagem do experimento seguiu o protocolo oferecido pela empresa, em que uma reação foi preparada com 7.5 μ l de Master Mix, 0.75 μ l de Reverse Primer, 0.75 μ l de Forward Primer, 1 μ l de H₂O (livre de RNase e DNase) e 5 μ l de amostra de cDNA, totalizando 15 μ l de solução. A concentração de *primer* na solução final foi 0.2 μ M e o cDNA utilizado foi diluído em dez vezes.

Preparação dos embriões para fotografia

Ao longo de 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização (hpf) alguns embriões de cada diluição eram selecionados para realizar registro fotográfico. A escolha do embrião em cada diluição e controle era feita com base na representatividade do grupo. Até 72 hpf, o embrião era colocado em placa de Petri contendo apenas solução E3 e fotografado. Em 96 hpf, devido ao embrião iniciar seu processo de natação, era utilizado solução de metil celulose para diminuir sua movimentação. Após a fotografia, os embriões eram mergulhados em meio E3 para retirar a solução de metil celulose e retornavam para a placa de 24 poços dos ensaios toxicológicos. Para realizar as fotografias foi utilizada a lupa Leica M205 FA (Modelo: MDG34; Câmera: DFC550).

Estatística

As características observadas nos ensaios toxicológicos foram classificadas como dados categóricos. As distribuições dos dados foram anormais. Por esta razão, o teste estatístico adotado para tratar os dados observados é o teste de Kruskal-Wallis. De acordo com Vieira (2011) este teste serve para identificar se três ou mais populações estatísticas possuem mesma distribuição. A hipótese da nulidade (H_0) é que a variável analisada possui a mesma distribuição nas populações de onde os tratamentos em comparação tiveram origem. A hipótese alternativa (H_1) é que existe diferença significativa nessas mesmas populações. Adotou-se o *p-valor* de $p < 0,05$.

Nos casos onde os resultados mostraram diferença significativa ($p < 0,05$), utilizamos o teste de Dunn para saber onde estão as diferenças. De acordo com Vieira (2011) este teste compara os postos médios de grupos dois a dois. Este teste não exige que os grupos possuam o mesmo número de observações, mas tem melhor aproximação quando as amostras são grandes. A hipótese da nulidade (H_0) é que os tratamentos analisados possuem populações estatísticas com os mesmos postos médios. A hipótese alternativa (H_1) é que os tratamentos analisados possuem populações estatísticas com postos médios diferentes. Adotou-se o *p-valor* de $p < 0,05$.

Todos os testes foram realizados com o programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Os gráficos foram realizados utilizando o programa Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010, versão: 14.0.7145.5000 – 32 bits).

Resultados

Resultados das características físico-química dos efluentes coletados no Canal Macaé-Campos

As características físicas e químicas dos efluentes coletados no mês de abril e outubro foram registradas imediatamente após sua coleta (TABELA 5). Amostras dos efluentes também foram encaminhadas ao LABSPECTRO/PUC com a finalidade de detectar e quantificar as concentrações de metais presentes nos efluentes (TABELA 6). Os resultados encontrados para as características físico-químicas não apresentaram valores acima dos indicadores sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes propostos na resolução CONAMA (2005) e CONAMA (2011). Entretanto, os valores de oxigênio dissolvido dos efluentes coletados no mês abril (4,2 mg/L) e outubro (2,7 mg/L) foram inferiores a 6 mg/L. De acordo com CONAMA (2005) a salinidade apresentou valores que classificam o efluente de abril como água doce e o efluente de outubro como água salobra. A condutividade encontrada no efluente de outubro (1550 $\mu\text{S}/\text{cm}$) é um indicador de ambientes impactados, pois seu valor foi superior a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (de Saneamento Ambiental, 1980). Em relação à dureza total, os resultados de 50 ppm de CaCO_3 indicados pelo teste LabconTest classificam os efluentes, em relação a dureza, como leves. Os testes LabconTest de amônia tóxica e nitrito não apresentaram valores para causar interferência nos ensaios toxicológicos. Em ambas as amostras, o pH (abril = pH 7,2; outubro = pH 7) esteve dentro da faixa considerada (entre 6 e 9).

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas das amostras de efluentes coletados no canal Macaé-Campos.

Canal Macaé-Campos		
Data de coleta	2/4/2014	15/10/2014
Amônia tóxica (ppm)	< 0,037	< 0,037
Condutividade (μ S)	-	1550
Dureza total (ppm de CaCO_3)	50	50
Nitrito (ppm)	0	0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4,2	2,7
pH	7,2	7
Salinidade (ppt)	0,2	0,8
Temperatura ($^{\circ}$ C)	25	25,4

Tabela 6 - Resultado da análise de metais pesados na amostra de água coletada no dia 02/04/2014 e 15/10/2014 comparados aos padrões de lançamento de efluentes pelas RESOLUÇÕES CONAMA (2005) e CONAMA (2011). Os seguintes elementos apresentaram concentração abaixo do limite de detecção (<0,001 mg/L): Ag, Au, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cs, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ge, Hf, Hg, Ho, In, Ir, La, Lu, Mo, Nb, Nd, Os, Pd, Pr, Pt, Re, Rh, Ru, Sb, Sm, Ta, Tb, Te, Th, Tl, Tm, U, Y, Yb, Zr. Os valores em amarelo destacam valores superiores ao proposto para qualidade da água por CONAMA (2005).

	CONAMA 2005 e 2011	02-abril	15- outubro
Elementos	Concentração (mg/L)		
As	0,5	0,002	0,001
B	5	0,061	<0,001
Ba	5	0,049	0,05
Ca	-	11,6	21,8
Cr	0,1	0,003	0,009
Cu	1	0,005	0,008
Fe	15	0,16	2,1
I	-	0,025	<0,001
K	-	16,3	62,1
Li	-	0,007	0,006
Mg	1	5,3	12,3
Mn	1	0,50	0,35
Na	-	77	227
Ni	2	0,002	0,003
Pb	0,5	<0,001	0,001
Rb	-	0,032	0,07
Sn	4	<0,001	0,001
Sc	-	< 0,005	<0,001
Se	0,3	< 0,005	< 0,005
Sr	-	0,107	0,13
Ti	-	0,014	0,05
V	-	0,002	<0,001
W	-	<0,001	0,002
Zn	5	0,042	0,07

Resultados obtidos com o efluente coletado em abril

Primeiro ensaio toxicológico

O primeiro ensaio toxicológico foi realizado após oito dias da coleta. A amostra esteve durante este tempo armazenada abaixo de 10°C sem congelamento. Os testes de toxicidade foram realizados utilizando um total de 100 ovos fertilizados em cada tratamento, incluindo o controle negativo. Os resultados da mortalidade nos embriões mostraram valores gradativos em C60 e C80 ao longo do tempo de exposição ao efluente (FIGURA 8). Ao término do ensaio com 96 hpf, o CTRL e a diluição C40 mostraram valores de 8% e 6% de mortalidade. As diluições C60 e C80 apresentaram mortalidade de 81% e 79%, respectivamente. O resultado do teste estatístico de Kruskal-Wallis (26,51) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p < 0,0001$. O teste de Dunn mostrou que entre C60 e C80 não há diferença entre si, assim como, entre C40 e CTRL também não há. Entretanto, existem diferenças em ambas as diluições, C60 ou C80, quando comparadas com a diluição C40 ou o CTRL.

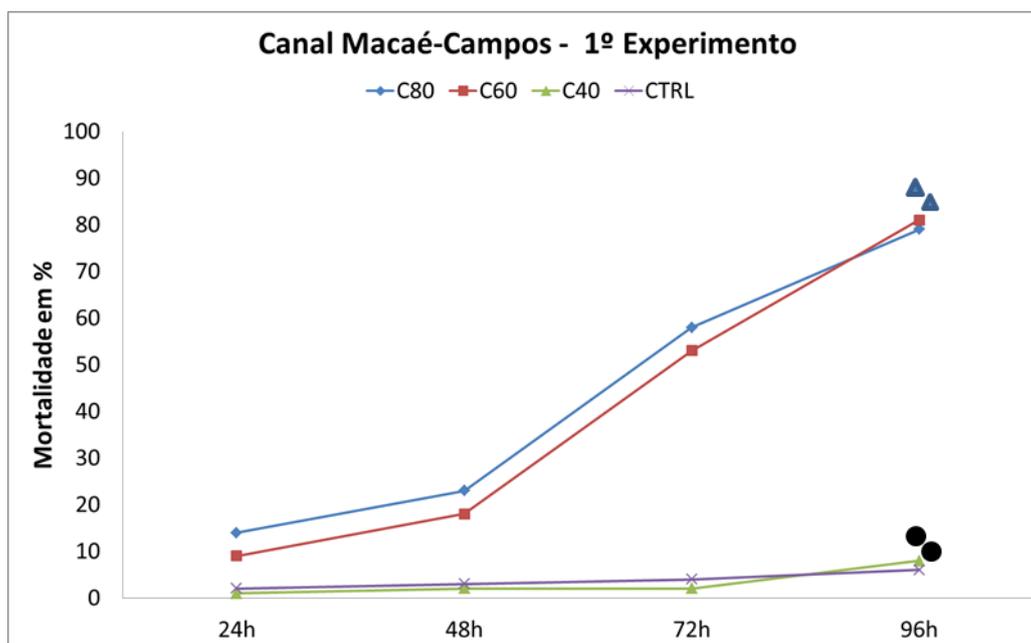


Figura 8 – Resultados da mortalidade de embriões de *Danio rerio* expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado após oito dias da coleta de amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Uma vez o ensaio iniciado, também foi registrado no período de 72hpf a sobrevivência e as alterações morfológicas ocorridas no desenvolvimento embrionário. No controle negativo observamos que 96% dos embriões estavam vivos e 84% desses

embriões já haviam eclodido; e não houve má-formação no desenvolvimento embrionário. Na diluição C40 a quantidade de embriões vivos foi de 98% e 86% dos embriões estavam eclodidos. Entretanto, na diluição C40 o surgimento de anomalias no desenvolvimento foi registrado com a formação de edemas no pericárdio (FIGURA 18), em que 6% dos embriões foram afetados. Na diluição C60, a sobrevivência dos embriões diminuiu e houve atraso no desenvolvimento, registrando apenas 47% de embriões vivos e 33% de embriões eclodidos. A formação de edemas no pericárdio atingiu um número maior nessa diluição em que 28% de embriões foram afetados. Na diluição C80, 42% dos embriões sobreviveram, porém apenas 6% dos embriões conseguiram se desenvolver até o estágio de eclosão. Aqueles que conseguiram se desenvolver foram afetados com a formação de edema no pericárdio (6% dos embriões). Assim, percebemos que os embriões que não eclodiram nas diluições C60 e C80 estavam vivos, porém não conseguiram se desenvolver até o estágio necessário para eclodirem e formar edemas no pericárdio.

O resultado estatístico de Kruskal-Wallis (14,95) em relação ao atraso no desenvolvimento observado pelo número de embriões eclodidos mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p= 0,0019$. O teste de Dunn mostrou diferença apenas na comparação de C80 com o CTRL e C40, $p<0,05$ (FIGURA 9). Em adição, o resultado estatístico de Kruskal-Wallis (13,68) em relação a formação de edema no pericárdio mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p= 0,0034$. O teste de Dunn mostrou diferença apenas na comparação de C60 com o CTRL e C40, $p<0,05$ (FIGURA 9).

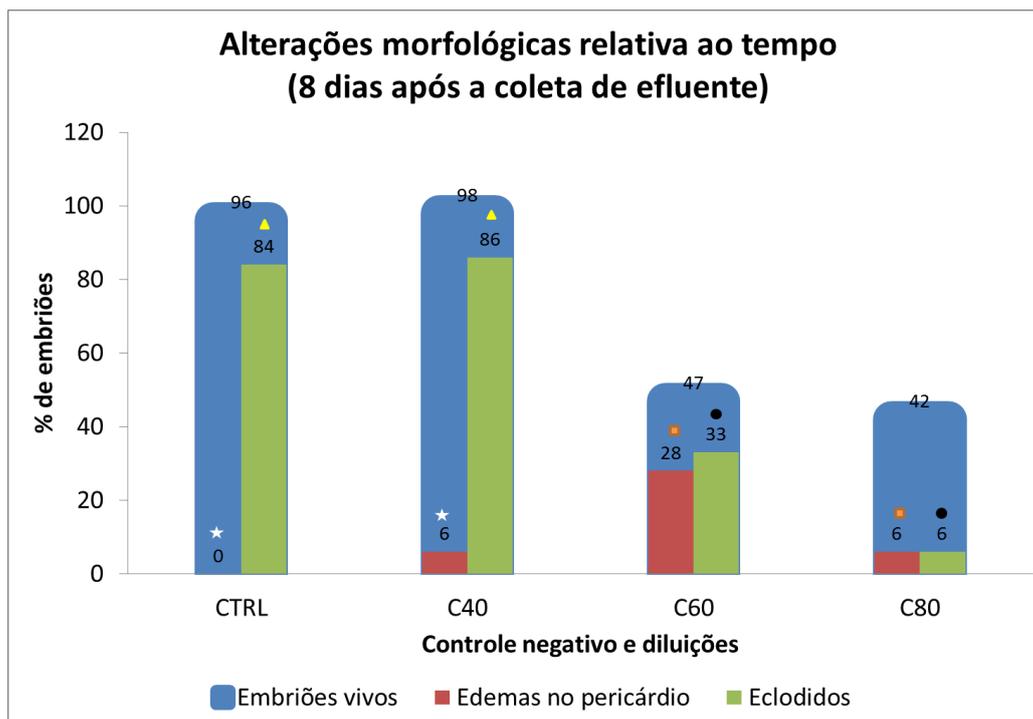


Figura 9 – 1º Experimento (10/04/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Segundo ensaio toxicológico

Após trinta e sete dias da amostra armazenada abaixo de 10°C sem congelamento, o efluente ainda apresentava potenciais agentes tóxicos. No que se refere à mortalidade (FIGURA 10), o CTRL não teve mortalidade. A diluição C40 apresentou 2% de embriões afetados. Nas diluições C60 e C80 apresentaram valores de 68% e 25%, respectivamente. A mortalidade em C60 e C80 ocorreu principalmente entre os períodos de 72 e 96 hpf. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (19.13) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p= 0,0003$. O teste de Dunn mostrou diferença apenas na comparação de C60 com o CTRL e C40.

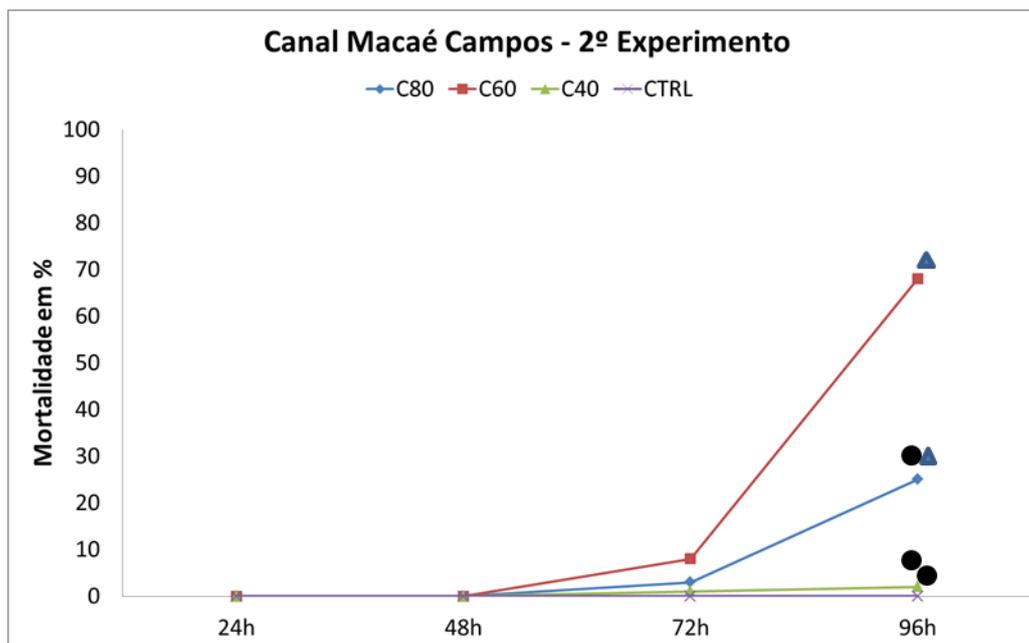


Figura 10 - Resultados da mortalidade de embriões de *Danio rerio* expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado trinta e sete dias após a coleta da amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Após 37 dias, a amostra de efluente conservada ainda era capaz de provocar alterações no desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio* (FIGURA 11). Durante o ensaio, no período de 72hpf, a sobrevivência desses indivíduos apresentava menos de 10% de embriões afetados no controle negativo e nas demais diluições. No controle negativo todos tiveram um desenvolvimento normal, ou seja, não houve más-formações, e todos alcançaram o estágio de eclosão. Na diluição C40, 76% dos embriões eclodiram e 23% sofreram com a formação de edema no pericárdio. Na diluição C60, o atraso no desenvolvimento foi maior fazendo que apenas 49% dos embriões chegassem a eclodir. Além disso, na diluição C60 37% dos embriões apresentaram formação de edema no pericárdio. E por fim, na diluição C80, embora a quantidade de embriões vivos fosse de 97%, nenhum dos embriões se desenvolveram normalmente, todos sofreram atraso e não alcançaram o estágio correspondente as 72 horas de desenvolvimento e isso pode ser percebido porque nenhum deles conseguiram eclodir. Entretanto, alguns dos embriões chegaram bem próximos ao estágio de eclosão, neles foram observados a formação de edema no pericárdio atingindo 52% dos embriões vivos.

O resultado estatístico de Kruskal-Wallis (32,75) para a característica de atraso no desenvolvimento observado pelo número de embriões eclodidos mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p < 0,0001$. O teste de Dunn mostrou diferença na comparação de C60 e C80 com o CTRL; e entre C80 e C40, $p < 0,05$. Em relação a formação de edema no pericárdio, o resultado do teste de Kruskal-Wallis (18,64) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados com $p = 0,0003$. O teste de Dunn mostrou diferença na comparação das diluições C80, C60 e C40 com o CTRL, $p < 0,05$. Não houve diferença entre as diluições.

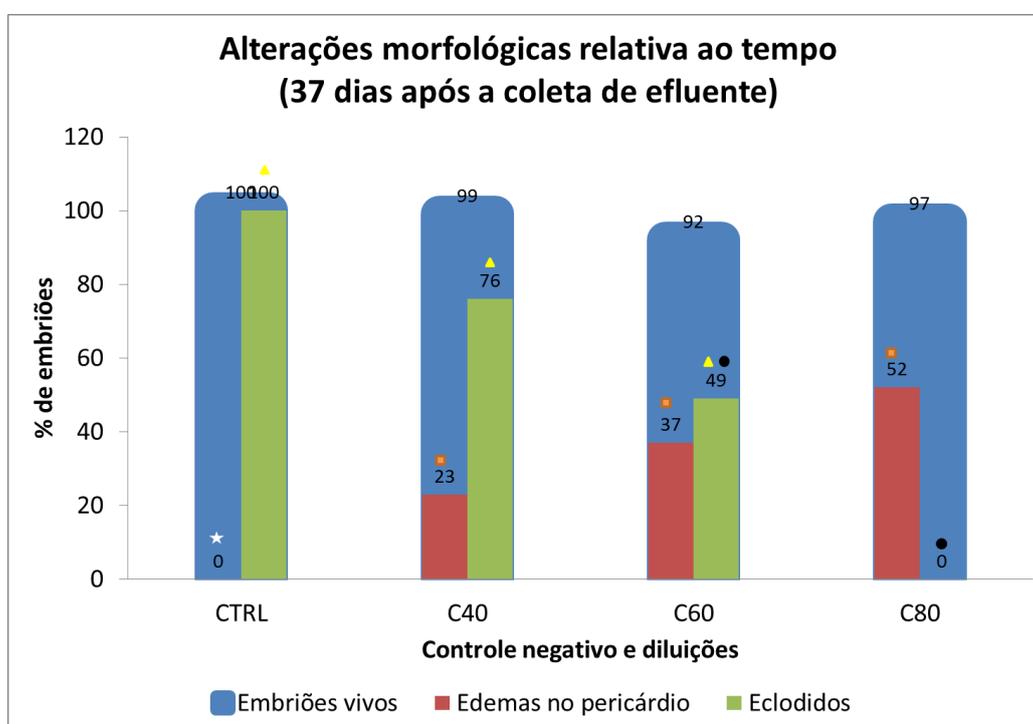


Figura 11 – 2º Experimento (08/05/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Terceiro ensaio toxicológico

O último ensaio toxicológico foi realizado após cinquenta dias de coleta da amostra de efluente do canal Macaé-Campos. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento durante este tempo. Os resultados obtidos apresentaram as mesmas características em comparação com os dois outros ensaios. Potenciais agentes tóxicos ainda estavam presentes, mas a quantidade de embriões afetados foi menor em

relação aos outros ensaios, ou seja, ao longo do tempo a toxicidade existente no efluente foi perdendo sua capacidade de alterar o desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio*.

Desta forma, percebemos que a mortalidade foi reduzida e gradativa; não houve mortes em um momento específico como no segundo ensaio (entre 72 e 96 hpf). Não houve morte no CTRL. Enquanto que nas diluições C40, C60 e C80, a mortalidade apresentou valores de 2%, 11% e 3%, respectivamente. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (2,398) não mostrou diferença significativa na distribuição dos dados, $p=0,4940$.

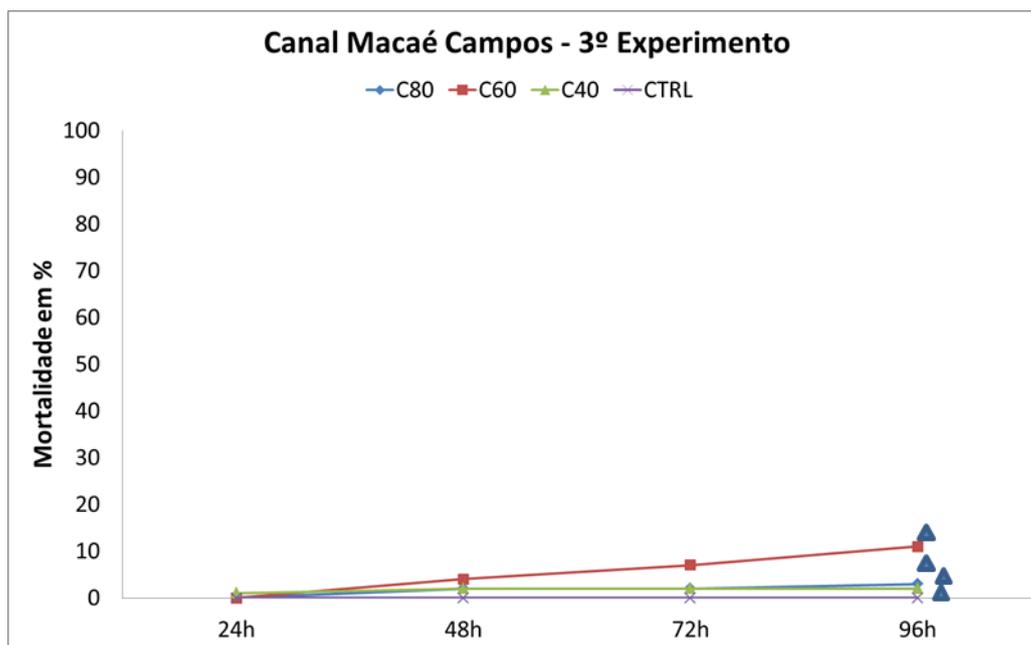


Figura 12 - Resultados da mortalidade de embriões de *Danio rerio* expostos a substâncias tóxicas presentes no efluente coletado em abril. Ensaio toxicológico realizado cinquenta dias após a coleta da amostra de efluente. Os valores em porcentagem mostram a soma total dos embriões afetados por tratamento. Os símbolos em 96hpf representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Em relação ao atraso no desenvolvimento (FIGURA 13), o número de embriões eclodidos foi de 98% dos embriões vivos. Na diluição C40 registrou-se valores de 86% de embriões eclodidos e 13% de embriões com edemas no pericárdio. Em C60, o número de embriões eclodidos foi de 80% e 3% de embriões com a formação de edemas. Em C80, a diluição mais afetada apresentando apenas 43% de embriões eclodidos e 29% dos embriões com edema. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (19,45) para o atraso no desenvolvimento observado através do número de embriões que se desenvolveram até a eclosão em 72hpf mostrou diferença significativa na distribuição dos dados, $p=0,0002$. O teste de Dunn mostrou diferença na comparação de C80 com C40 e o CTRL, $p<0,05$. Em adição, o resultado do teste de Kruskal-Wallis (19,02) para

o número de embriões afetados com a formação de edemas no pericárdio mostrou diferença significativa na distribuição dos dados, $p= 0,0003$. O teste de Dunn mostrou diferença na comparação de C80 com C60 e o CTRL, $p<0,05$.

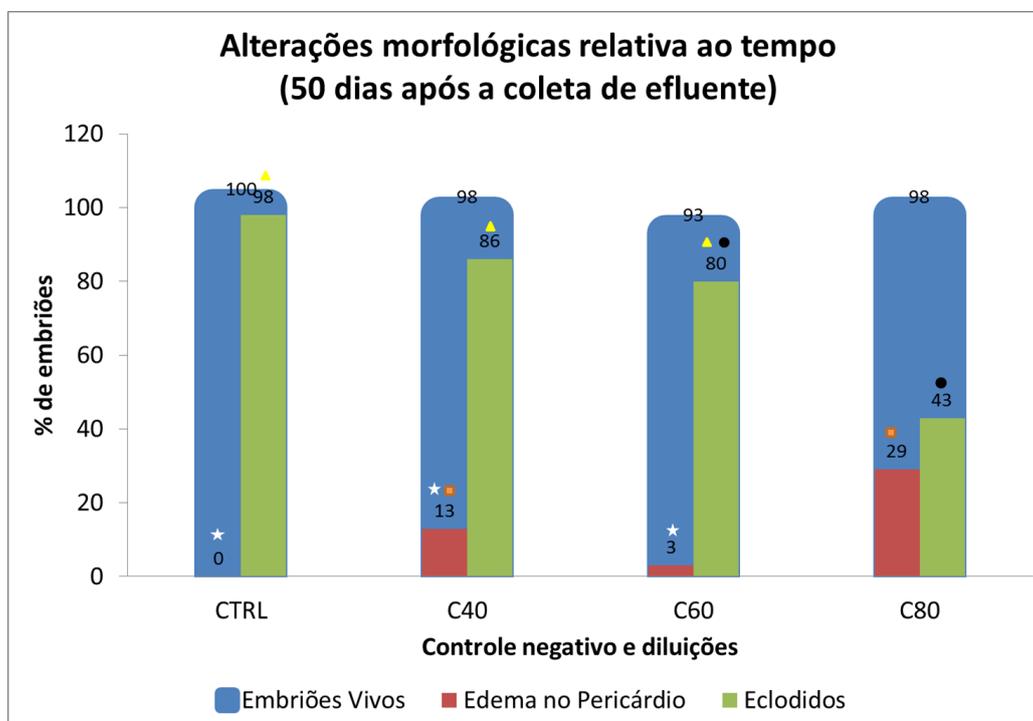


Figura 13 – 3º Experimento (22/05/2014). Ensaio toxicológico realizado com efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 72hpf. As barras indicam a soma total dos embriões afetados; valores mostrados em porcentagem. Os símbolos representam as diferenças entre os tratamentos obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Comparação da mortalidade nos três ensaios toxicológicos

Os resultados a seguir é uma comparação da proporção de embriões mortos em 96hpf nos três ensaios toxicológicos. O CTRL obteve menos de 10% de morte nos três ensaios, o que permitiu a validação de todos eles. A diluição C40 também obteve menos de 10% de embriões mortos. As diluições c60 (1º exp.=81%; 2º exp.= 68%; 3º exp.=11%) e c80 (1º exp.=79%; 2º exp.= 25%; 3º exp.=3%) apresentaram diminuição no número de embriões afetados ao longo do tempo. Essa diminuição no número de embriões afetados indica a degradação dos agentes tóxicos. Consequentemente, o potencial de causar alterações no desenvolvimento do embrião também perde seus efeitos. O resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p<0,05$) para o CTRL, C60 e C80 com valores de 11,54, 13,17, 17,06, respectivamente. O teste de Kruskal-Wallis para C40 apresentou valor de 1,132, $p= 0,5678$. O teste de Dunn no CTRL mostrou diferença do 1º exp. para o 2º e 3º exp.; na diluição C40, não houve diferença;

na diluição C60, o 3º exp. foi diferente do 1º e 2º exp.; na diluição C80, o 1º exp. foi diferente do 2º e 3º exp.

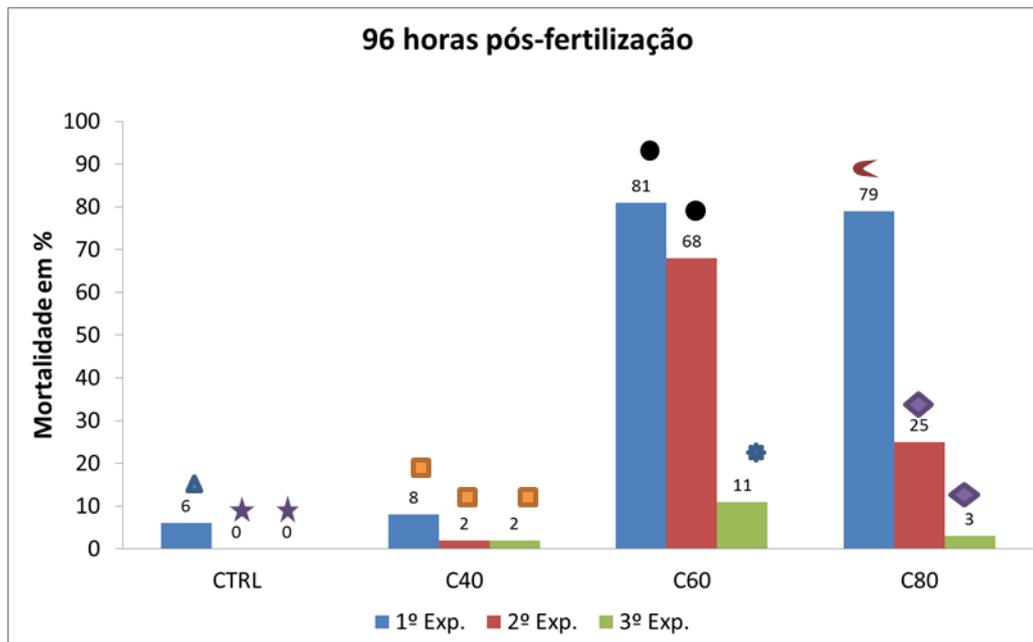


Figura 14 – Comparação da mortalidade dos embriões expostos ao efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos nos três ensaios toxicológicos. Os ensaios aconteceram em momentos diferentes. O primeiro ensaio iniciou com oito dias após a coleta do efluente; o segundo experimento com 37 dias após a coleta; e o terceiro experimento com 50 dias após a coleta. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. As barras indicam a soma total dos embriões afetados em cada experimento separados por tratamento. Os símbolos representam as diferenças obtidas entre os experimentos através do teste estatístico de Dunn.

Resultados dos testes com os biomarcadores

As FIGURAS 15 e 16 apresentam os resultados das expressões dos genes *cyp1a1* e *mt2*. Os dados foram obtidos com os embriões usados no primeiro ensaio toxicológico. Em relação ao *cyp1a1*, em todos os tratamentos contendo o efluente houve um aumento na expressão do gene em comparação ao controle. Quanto mais concentrado a solução com o efluente, maior o valor da expressão do gene *cyp1a1* (CTRL= 1; C40= 1,6; C60= 1,6; C80= 3,2). Enquanto que o oposto ocorreu a *mt2*. O gene *mt2* ao invés de expressar a mesma quantidade que o controle, sofreu uma diminuição na expressão. Quanto mais concentrada a solução com o efluente, menor a expressão de *mt2* (CTRL= 1; C40= 1,1; C60= 0,3; C80= 0,2).

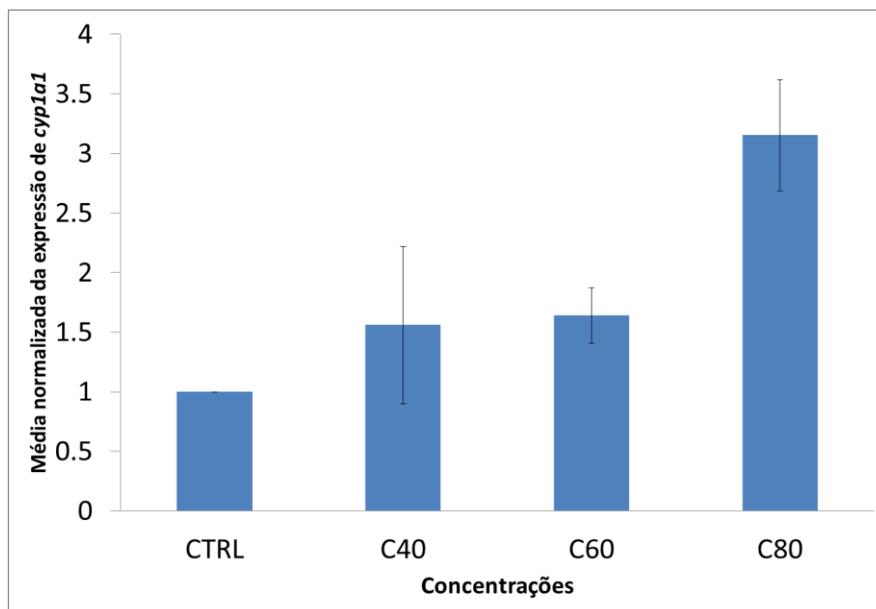


Figura 15 – Expressão gênica de *cyp1a1*. Embriões expostos ao efluente coletado no canal Macaé-Campos no mês de abril, oito dias após a coleta. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

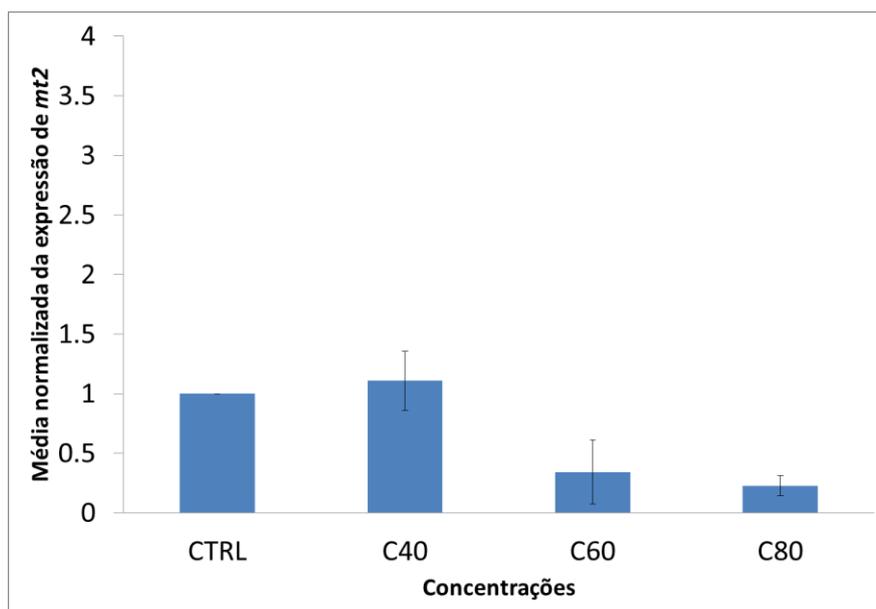


Figura 16 – Expressão gênica de *mt2*. Embriões expostos ao efluente coletado no canal Macaé-Campos no mês de abril, oito dias após a coleta. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Resultados das alterações morfológicas

A seguir na FIGURA 17 temos imagens representativas dos embriões em 24 horas pós-fertilização (hpf). Em (A) temos o desenvolvimento normal do controle negativo, apresentando o estágio prim-6 (25h). Em (B), temos a diluição C40 que mostrou acompanhar o mesmo estágio que o CTRL. Na diluição C60 houve variação nos atrasos (C e D). Em (C) o estágio se encontra em 14-somite (16h) e (D) em 18-

somite (18h). Na diluição C80 também houve atrasos no desenvolvimento. Os estágios observados na diluição C80 foram (E) 10-somite (14h) e (F) 26-somite (22h). Na FIGURA 18 temos imagens representativas dos embriões em 96 hpf. O controle negativo (G) se desenvolveu normal até o momento de iniciar o processo de inflar a bexiga natatória. Na diluição C40 (H e I), os embriões apresentaram atraso em relação ao controle. Em (H) o estágio do embrião é o mesmo de pec fin (60h). Em (I) o estágio do embrião é o mesmo de protruding mouth (72h) e apresentou a formação de edema no pericárdio. Nas diluições C60 (J) e C80 (L) o estágio mais avançado encontrado foi pec fin (60h). Em J e L além do atraso, houve formação de edema no pericárdio, consumo irregular do vitelo e má-formações no crânio e na face.

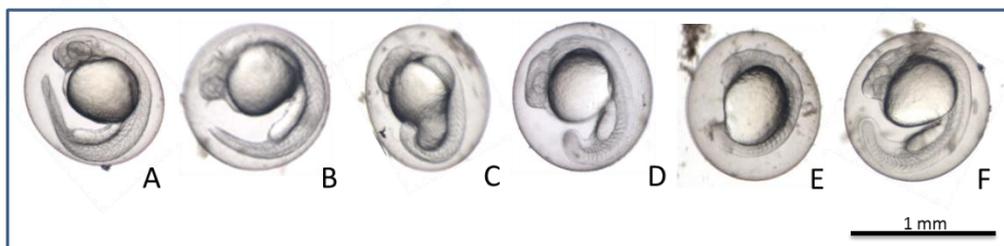


Figura 17 - Análise da morfologia dos embriões em 24 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de abril de 2014. As imagens de A-F estão representando o desenvolvimento em 24hpf. (A) controle negativo (CTRL): apresentou desenvolvimento normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). (B) diluição com 40% de efluente: o desenvolvimento foi parecido com CTRL. Na diluição com 60% (C-D) e 80% (E-F) de efluente, os embriões apresentaram atrasos em diferentes estágios quando comparados com o CTRL. A escala está representada por um traço negro e corresponde a 1 milímetro.

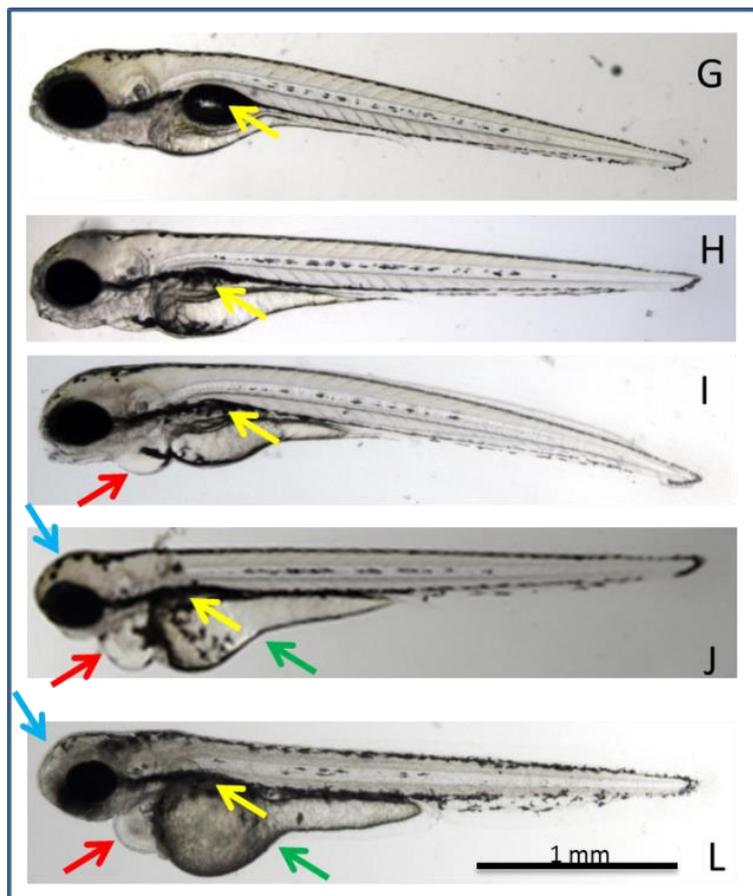


Figura 18 – Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de abril de 2014. As imagens de G-L estão representando o desenvolvimento em 96hpf. (G) controle negativo (CTRL): normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). O CTRL apresentou bexiga natatória inflada (seta amarela). (H-I) diluição com 40% de efluente: atraso no desenvolvimento e desenvolvimento de edema no pericárdio (seta em vermelho). Na diluição com 60% (J) e 80% (L) de efluente houve má-formação do crânio e da face (seta em azul), consumo irregular do vitelo (seta em verde), formação de edema no pericárdio (seta em vermelho) e atraso no desenvolvimento. A escala representada por um traço negro (L) corresponde a 1 milímetro e se aplica a todos os embriões.

Resultados obtidos com o efluente coletado em outubro

Primeiro ensaio toxicológico

O primeiro ensaio foi realizado após dez dias da coleta da amostra de efluente do canal Macaé-Campos referente ao mês de outubro. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. Na TABELA 7 temos as médias de oxigênio, pH e temperatura durante as 96 horas pós-fertilização. As diluições apresentaram oxigênio <5 mg/L e o CTRL apresentou média de 7,7 mg/L \pm 0.5. O pH das diluições esteve entre 7 e 7,5. O pH do controle apresentou média de 6,3 \pm 0,3. A temperatura foi ambiente com média de 25°C \pm 1 e corresponde ao momento de medida do oxigênio e do pH.

Tabela 7 – Primeiro ensaio toxicológico. Variações de oxigênio e pH na amostra do mês outubro durante 96hpf.

	Oxigênio (mg/l)	pH	Temperatura (°C)
Efluente sem diluição	2,4 ±0,6	7,4 ±0,2	25 ±1
CTRL	7,7 ±0,5	6,3 ±0,3	25 ±1
C20	4,8 ±1,0	7,3 ±0,1	25 ±1
C30	3,6 ±1,7	7,4 ±0,1	25 ±1
C40	2,9 ±1,7	7,4 ±0,1	25 ±1
C60	2,9 ±1,7	7,4 ±0,1	25 ±1

Os resultados das análises morfológicas apontaram atrasos no desenvolvimento em todas as diluições. A FIGURA 19 representa o estágio de desenvolvimento de 48 horas pós-fertilização (hpf). Em A, o CTRL apresentou desenvolvimento normal apresentando estágio próximo ao observado em long pec (48h). Entre B-E, seguem os embriões expostos às diluições C20, C30, C40 e C60, respectivamente. B: embrião com estágio high pec (42h). C: embrião com estágio 18-somite (18h). D: embrião com estágio 3-somite (11h). E: embrião com estágio germ-ring (5,7h).

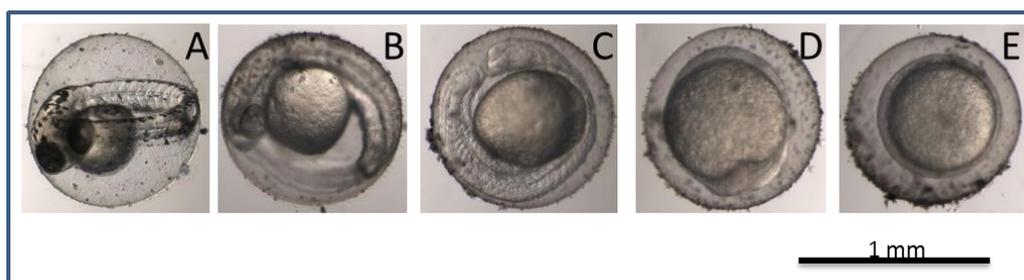


Figura 19 - Análise da morfologia dos embriões em 48 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. As imagens de A-E estão representando o desenvolvimento em 48 horas pós-fertilização (hpf). (A) controle negativo (CTRL): apresentou desenvolvimento normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). (B) diluição com 20% de efluente: estágio high pec (42h). (C) diluição com 30%: estágio de 18-somite (18h). (D) diluição com 40% de efluente: estágio de 3-somite (11h). (E) diluição com 60% de efluente: estágio de germ-ring (5,7h). Todas as diluições apresentaram atraso no desenvolvimento. A escala está representada por um traço negro e corresponde a 1 milímetro.

A FIGURA 20 representa o estágio de desenvolvimento de 96 horas pós-fertilização (hpf). Em F, o CTRL apresentou desenvolvimento normal apresentando

estágio com 96hpf e a bexiga natatória começando a inflar. Em G, é possível observar o embrião exposto à diluição C20 com o desenvolvimento em pec fin (60h), apresentando consumo irregular do vitelo e má-formação do crânio e face. Em H, o embrião exposto à diluição C30 apresenta estágio prism-6 (25h). Em I, observamos o embrião exposto à diluição C40 no estágio de 10-somite (14h). Na diluição C60, todos os embriões estavam mortos em 96h de exposição ao efluente.

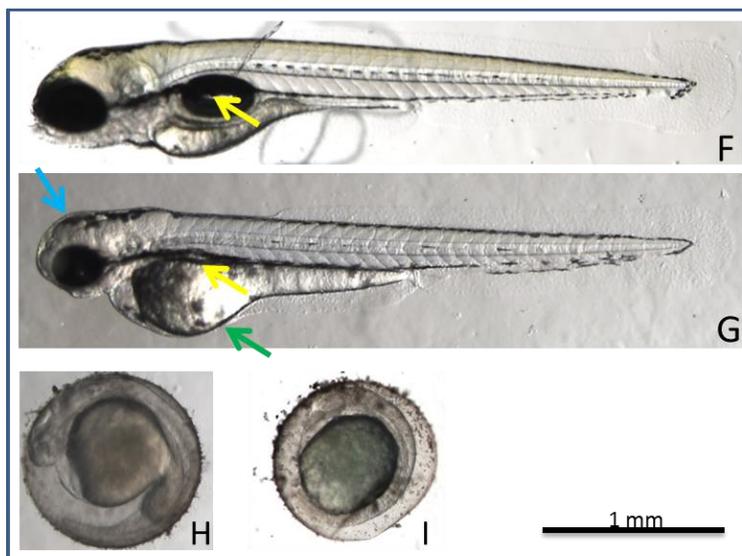


Figura 20 – Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Sem alteração no amostra de efluente. As imagens de F-I estão representando o desenvolvimento em 96hpf. (F) controle negativo (CTRL): normal de acordo com o proposto por Kimmel *et al.* (1995). O CTRL apresentou bexiga natatória (seta amarela) inflada. (G) diluição com 20% de efluente: atraso no desenvolvimento, consumo irregular do vitelo (seta em verde) e má-formação do crânio e face. (J) diluição com 30% de efluente: estágio prism-6 (25h). (L) diluição com 40% de efluente: estágio 10-somite (14h). A escala representada por um traço negro corresponde a 1 milímetro e se aplica a todos os embriões.

Os embriões expostos às diluições C30 e C40 não conseguiram se desenvolver a ponto de eclodirem. No CTRL e na diluição C20 todos os embriões vivos eclodiram (FIGURA 21). O teste de Kruskal-Wallis (91,44) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados sobre os embriões eclodidos, $p < 0,0001$. O teste de Dunn indicou diferença significativa entre o CTRL e as diluições C30, C40 e C60; a diluição C20 também foi diferente de C30, C40 e C60; não houve diferença entre CTRL e C20, $p < 0,05$ em todas as comparações. Nas diluições C20, C30, C40 e C60 as proporções de mortes em 96hpf foi de 10%, 0%, 5% e 100%, respectivamente; não houve mortes no CTRL (FIGURA 21). A mortalidade apresentou diferença na distribuição dos dados através do teste Kruskal-Wallis (83,63), $p < 0,0001$. O teste de Dunn mostrou diferença significativa entre C60 quando comparado com o CTRL, C20, C30 e C40, $p < 0,05$.

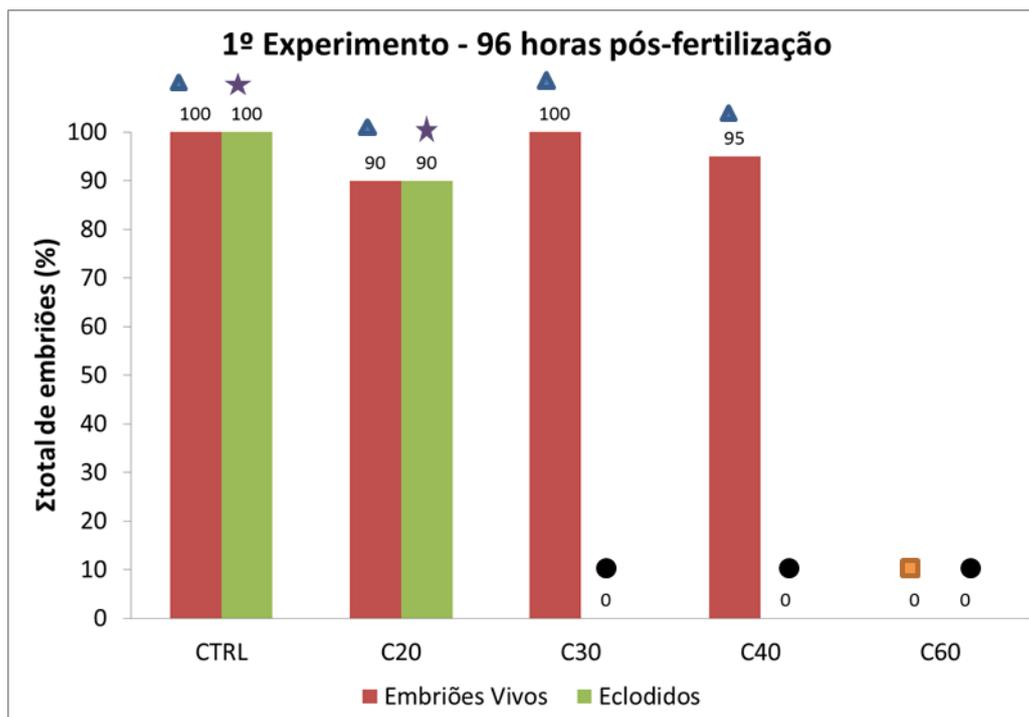


Figura 21 – 1º Experimento (25/10/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Segundo ensaio toxicológico

O segundo experimento foi realizado vinte dias após a coleta do efluente no canal Macaé-Campos no mês de outubro. Neste experimento, mudamos as condições da água, aerando o efluente com a finalidade de aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido. Assim, as concentrações de oxigênio nas diluições e controle negativo apresentaram valores $\geq 5\text{mg/L}$ (TABELA 7). Entretanto, a oxigenação da amostra provocou alguma reação entre os compostos químicos, alterando o pH. O pH da amostra de efluente de 7.2 aumentou para 8.3, transformando o pH neutro em básico. Como as diluições foram feitas com o meio E3 e seu pH foi de $5,8 \pm 0,2$, essas condições promoveram variações no pH das diluições C20, C30, C40 e C60 (TABELA 8).

Tabela 8 - Variações de oxigênio e pH na amostra do mês outubro durante 96hpf. Estas condições foram observadas após aeração do efluente durante 3h30min para a realização do segundo ensaio toxicológico.

	Oxigênio (mg/l)	pH	Temperatura (°C)
Efluente sem diluição	5,7 ±1,5	8,1 ±0,2	25 ±1
CTRL	6,2 ±0,5	5,8 ±0,2	25 ±1
C20	5,8 ±0,4	7,3 ±0,3	25 ±1
C30	5,5 ±0,4	7,7 ±0,1	25 ±1
C40	5,6 ±0,5	7,8 ±0,1	25 ±1
C60	5,6 ±0,6	7,9 ±0,1	25 ±1

As alterações morfológicas em 96hpf foram observadas somente o atraso no desenvolvimento (FIGURA 21). Em A, o CTRL apresentou desenvolvimento normal. Em B, o embrião exposto a diluição C20 demonstra estágio igual ao CTRL. Em C, o embrião está exposto à diluição C30 com estágio long pec (48h). Encontramos alterações no consumo do vitelo e na formação do crânio e face. Em D, a diluição utilizada foi C40 e o embrião apresentou estágio long pec (48h). Os embriões apresentaram consumo irregular, pouca ou quase nenhuma pigmentação e má-formação do crânio e face. Em E, os embriões não conseguiram se desenvolver na diluição C60 e estagnaram no estágio 18-somite (18h).

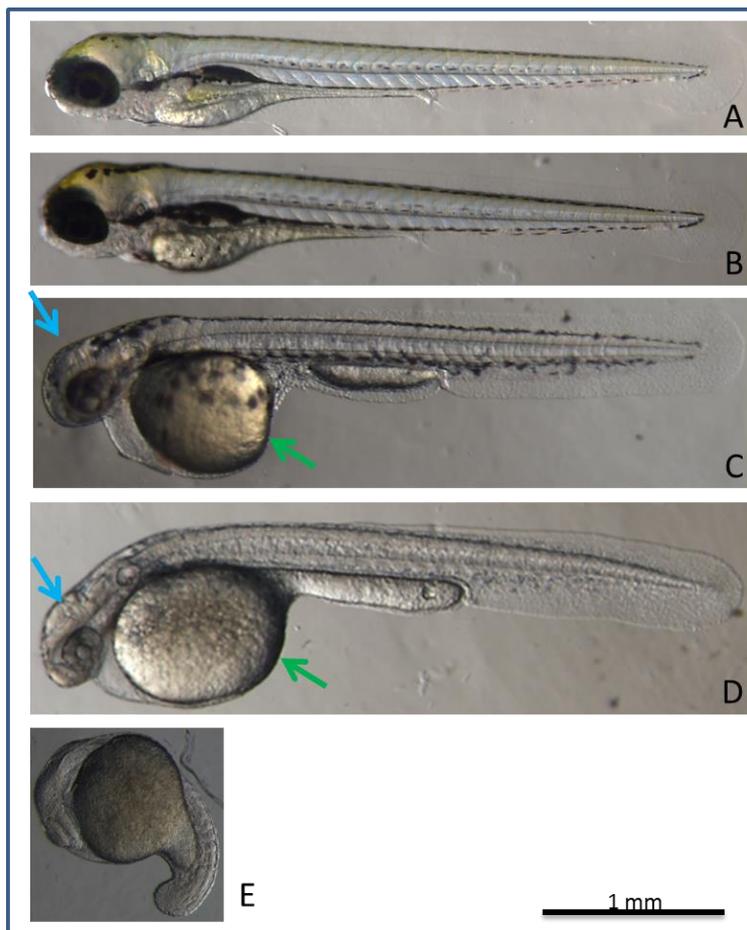


Figura 22 - Análise da morfologia dos embriões em 96 horas pós-fertilização (hpf) dos embriões de *Danio rerio* expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Amostra de efluente aerada. O controle negativo (CTRL) está representado na imagem A, e apresenta desenvolvimento normal. A imagem B apresentou estágio igual ao CTRL (96h). A imagem C mostra o desenvolvimento do embrião exposto à diluição C30 com estágio em long pec (48h). Em D a diluição usada foi C40 e o estágio alcançado pelo embrião foi entre long pec (48h). Na imagem E a diluição C60 provocou atraso no desenvolvimento no embrião, alcançando apenas o estágio de 18-somite (18h). As setas em azul indicam a má-formação do crânio e face. As setas em verde apontam a grande quantidade de vitelo. A grande quantidade de vitelo indica consumo irregular.

Na FIGURA 23 estão os resultados encontrados para eclosão em 96hpf. No CTRL e na diluição C20, todos os embriões eclodiram. As diluições C40 e C30 tiveram 5% e 20% de embriões eclodidos, respectivamente. Na diluição C60 os embriões não alcançaram o estágio de eclosão. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (82,40) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados referente aos embriões eclodidos, com intervalo de confiança de $p < 0.0001$. O teste de Dunn mostrou diferença entre C30, C40 e C60 com o CTRL e C20. Não houve diferença entre C20 e o CTRL.

Em relação à mortalidade (FIGURA 23), nas diluições C20, C30, C40 e C60 as proporções foram de 0%, 5%, 0% e 15%, respectivamente. Não houve mortes no

CTRL. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (8,766) não mostrou diferença significativa na distribuição dos dados, com intervalo de confiança de $p=0,0672$.

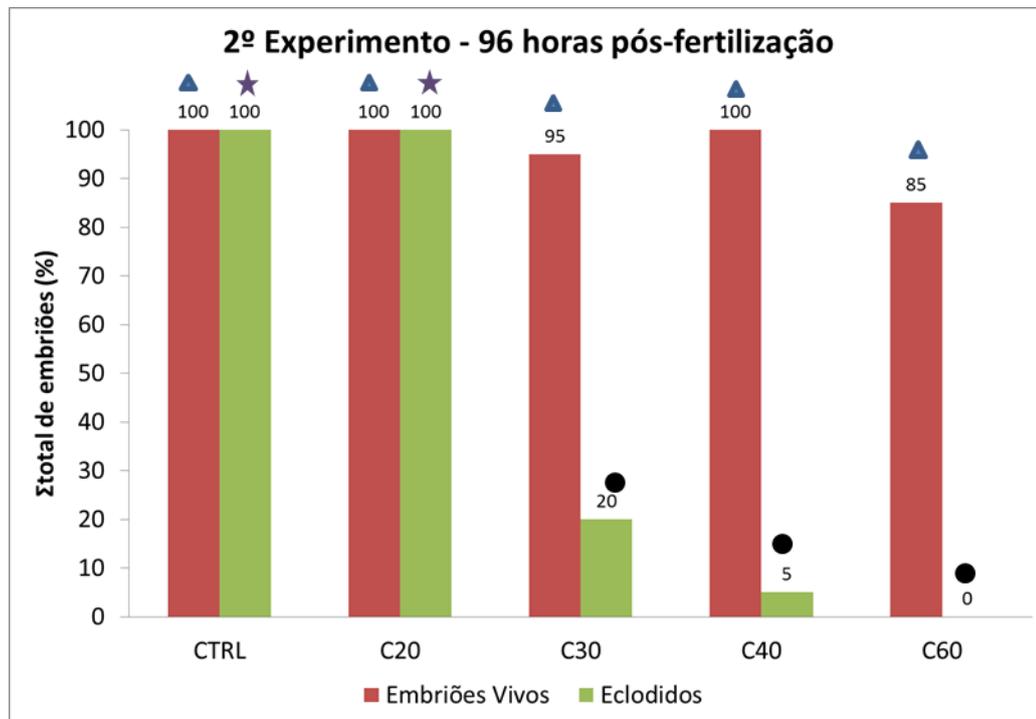


Figura 23 – 2º Experimento (04/11/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Diferente do primeiro ensaio, neste o efluente foi aerado antes de iniciar por 3h30min. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Terceiro ensaio toxicológico

O terceiro experimento foi realizado vinte sete dias após a coleta do efluente lançado no canal Macaé-Campos em outubro. A amostra durante este tempo esteve resfriada a 10°C sem congelamento. Diferente do primeiro ensaio, a amostra foi filtrada, eliminando microrganismos e qualquer partícula sobrenadante na solução. Os resultados encontrados para o oxigênio dissolvido foram abaixo de 6 mg/L em todas as diluições (TABELA 9).

Tabela 9 – Resultados do oxigênio dissolvido, pH e temperatura no experimento com amostra filtrada durante 96hpf. Amostra coletada no canal Macaé-Campos em outubro.

	Oxigênio (mg/l)	pH	Temperatura (°C)
Efluente sem diluição	2,4 ±1,4	7,7 ±0,5	25 ±1
CTRL	5,8 ±0,2	6,4 ±0,4	25 ±1
C20	5,1 ±0,4	7,5 ±0,3	25 ±1
C30	4,5 ±0,8	7,6 ±0,4	25 ±1
C40	3,9 ±1,0	7,7 ±0,4	25 ±1
C60	3,6 ±1,7	7,8 ±0,4	25 ±1

Na FIGURA 24 estão as imagens representando possíveis alterações morfológicas em 96hpf. Na imagem A temos o CTRL com desenvolvimento normal em 96hpf já com a bexiga natatória inflada. A imagem B, o embrião foi exposto a diluição C20 e o estágio de desenvolvimento observado é o mesmo do CTRL. Em C, a diluição utilizada foi C30 e o embrião apresentou atraso no desenvolvimento, sendo o estágio encontrado protruding mouth (72h). Na imagem D foi utilizado a diluição C40 e o estágio apresentado pelos embriões foi entre pec fin (60h) e protruding mouth (72h). A diluição C60 (Imagem E) apresentou também o atraso no desenvolvimento, em que o embrião alcançou apenas o estágio de prism-16 (31h).

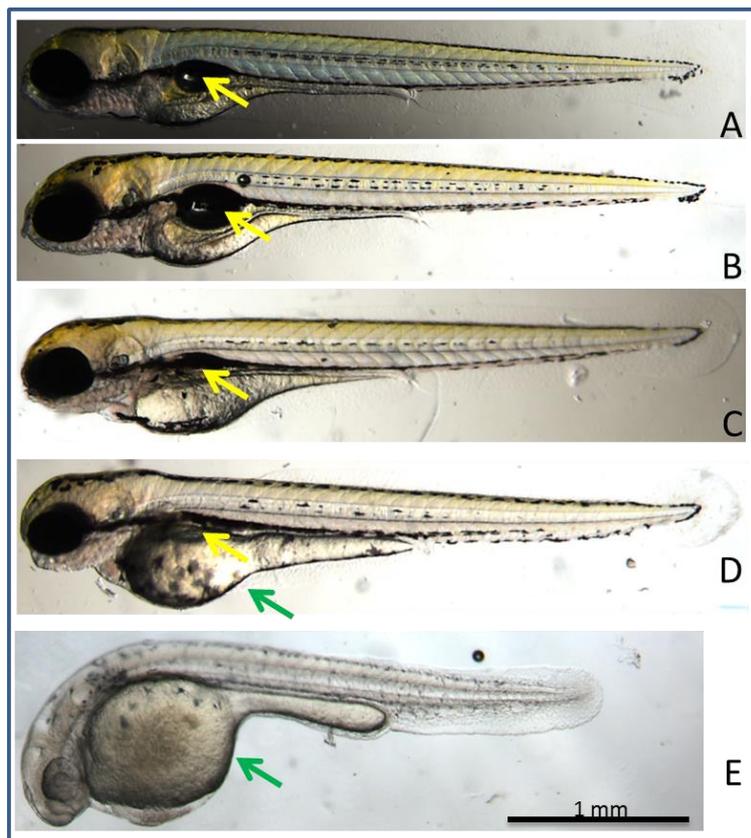


Figura 24 – Análise da morfologia dos embriões de *Danio rerio* em 96 horas pós-fertilização (hpf) expostos ao efluente do canal Macaé-Campos coletado no mês de outubro de 2014. Amostra de efluente filtrada. O controle negativo (CTRL) está representado na imagem A, e apresenta desenvolvimento normal. A imagem B apresentou estágio igual ao CTRL (96h com a bexiga natatória inflada). A imagem C mostra o desenvolvimento do embrião exposto a diluição C30 com estágio em protruding mouth (72h). Em D a diluição usada foi C40 e o estágio alcançado pelo embrião foi entre pec fin (60h) e protruding mouth (72h). Na imagem E a diluição C60 provocou atraso no desenvolvimento no embrião, alcançando apenas o estágio de prism-16 (31h). As setas em amarelo indicam a bexiga natatória. As setas em verde apontam a grande quantidade de vitelo. A grande quantidade de vitelo indica consumo irregular.

O CTRL e as diluições C20, C30 e C40 tiveram todos os embriões eclodidos. O CTRL e C20 já apresentavam a bexiga natatória inflada. Na diluição C60 os embriões não alcançaram o estágio de eclosão. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (47,03) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados referente aos embriões eclodidos, $p < 0,0001$. O teste de Dunn mostrou diferença significativa entre C60 com o CTRL e as demais diluições.

Em relação à mortalidade, não houve mortes no CTRL e nas diluições C20 e C30. Nas diluições C40 e C60 as proporções foram de 25% e 70%, respectivamente. O resultado do teste de Kruskal-Wallis (77,39) mostrou diferença significativa na distribuição dos dados, $p < 0,0001$. O teste de Dunn mostrou diferença entre C60 com o CTRL e as demais diluições.

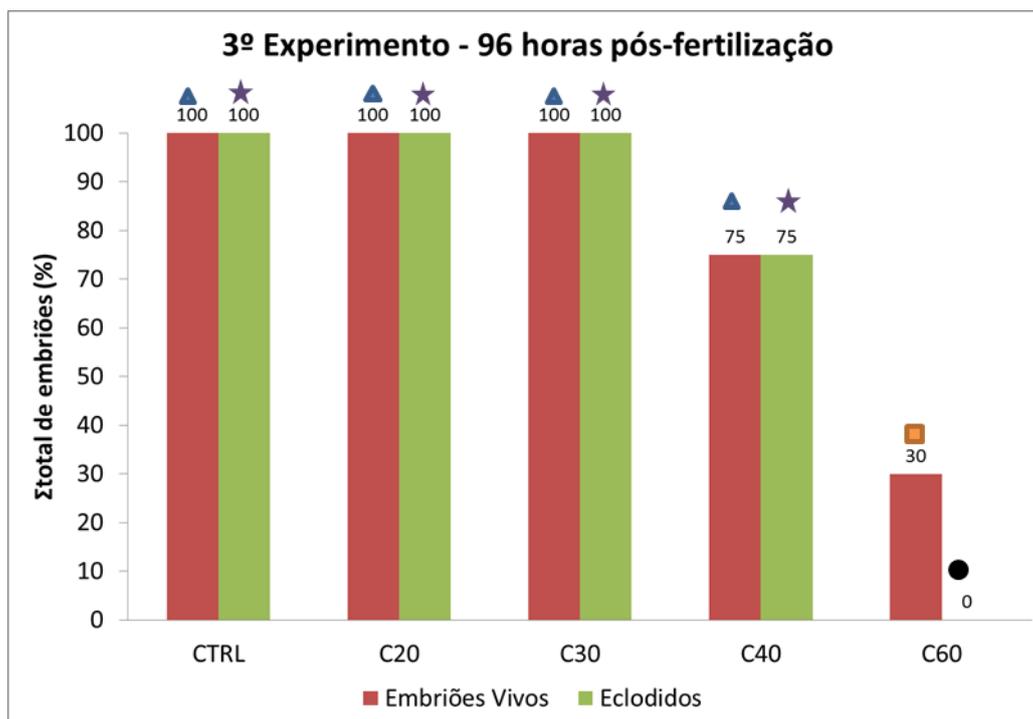


Figura 25 – 3º Experimento (11/11/2014). Efeitos da toxicidade sobre os embriões vivos em 96hpf. A baixa proporção de indivíduos eclodidos neste ensaio indica atraso no desenvolvimento embrionário. Diferente do primeiro ensaio, neste ensaio, o efluente foi filtrado antes de iniciar. Os símbolos representam as diferenças entre as diluições e o controle negativo, obtidas com o teste estatístico de Dunn.

Comparação da mortalidade nos três ensaios toxicológicos

O primeiro ensaio iniciou no dia 25/10/2014, o segundo no dia 04/11/2014 e o terceiro no dia 11/11/2014. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. Não houve morte no CTRL dos três ensaios. O resultado que mais explica o que houve no efluente, está representado na diluição C60. O oxigênio na diluição C60 no primeiro ($2,9 \pm 1,7$), segundo ($5,6 \pm 0,6$) e terceiro ($3,6 \pm 1,7$) ensaios pode ter sido o motivo da mortalidade e do atraso no desenvolvimento. O teste de Kruskal-Wallis foi feito comparando cada diluição nos três ensaios. O resultado do teste de Kruskal-Wallis foi significativo ($p < 0,05$) apenas para C40 e C60 com valores de 7,648 e 30,92, respectivamente. O teste de Dunn em C40 mostrou diferença do 2º para o 3º exp.; na diluição C60, o 2º exp. foi diferente do 1º e 3º exp.

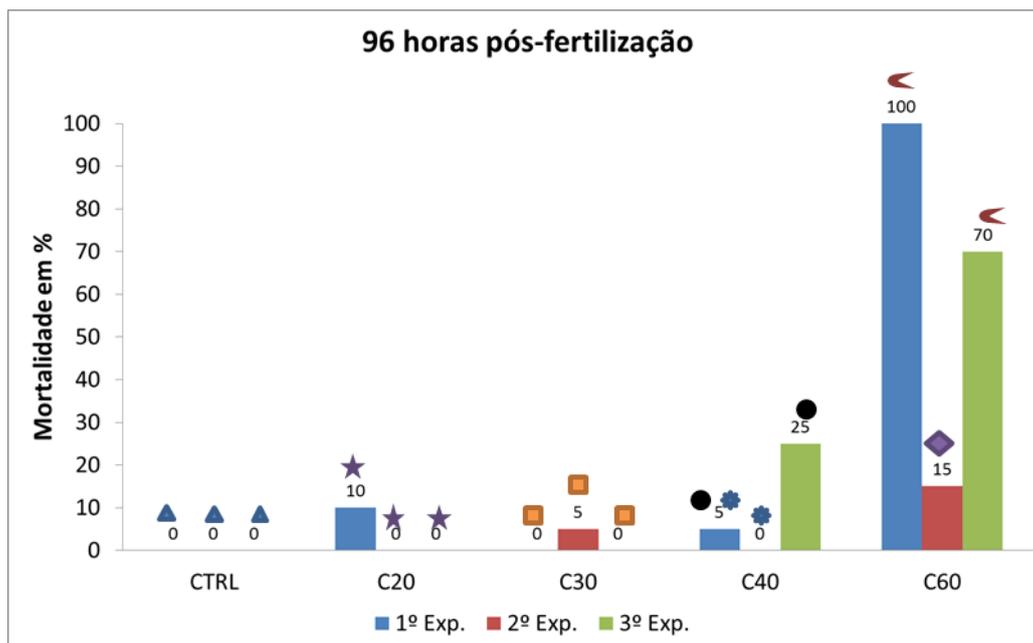


Figura 26 – Comparação da mortalidade dos embriões expostos ao efluente coletado em outubro no canal Macaé-Campos nos três ensaios toxicológicos. As barras representam o somatório total de embriões (valores em %). Os ensaios aconteceram em momentos diferentes. O primeiro ensaio iniciou no dia 25/10/2014; o segundo no dia 04/11/2014; e o terceiro no dia 11/11/2014. A amostra esteve resfriada abaixo de 10°C sem congelamento. Os símbolos representam as diferenças entre os experimentos realizados em momentos diferentes. Essas diferenças foram obtidas através do teste estatístico de Dunn.

Resultados das análises físico-química do efluente coletado na Lagoa Imboassica e das alterações morfológicas observadas nos embriões

As características físico-químicas do efluente coletado no mês de julho foram registradas imediatamente após sua coleta (TABELA 10). Os resultados encontrados para as características físico-químicas não apresentaram valores acima dos indicadores sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes propostos na resolução CONAMA (2005) e CONAMA (2011). Entretanto, avaliando os resultados com os critérios de qualidade da água classe 1 proposto na resolução CONAMA (2005), o valor de oxigênio dissolvido do efluente coletado foi de 0,59 mg/L, quando deveria ter sido ≥ 6 mg/L. De acordo com CONAMA (2005) a salinidade apresentou valor (0,5 ppt) que classifica o efluente como água salobra. A condutividade encontrada no efluente de outubro (918 $\mu\text{S}/\text{cm}$) é um indicador de ambientes impactados, pois seu valor foi superior a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (de Saneamento Ambiental, 1980). Em relação à dureza total, os resultados de 50 ppm de CaCO_3 indicados pelo teste labconTest classificam os efluentes como leves. Os testes labconTest de amônia tóxica e nitrito não apresentaram valores para causar interferência nos ensaios toxicológicos. A amostra obteve pH 7,4, portanto dentro da faixa considerada (entre 6 e 9).

O experimento foi feito com sete dias após a coleta. Durante este tempo a amostra esteve conservada em temperatura a menos 10°C, sem congelamento. Os valores de oxigênio, pH e temperatura foram medidos durante as 96hpf (TABELA 11). O oxigênio nas diluições foram maiores que 5 mg/L. O pH variou de 6,9 a 7,4, consideramos como pH neutro. A temperatura no momento das medições foi ambiente, em torno de 25°C ±1.

Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas das amostras de efluentes coletados na Lagoa Imboassica.

Lagoa Imboassica	
Data de coleta	15/7/2014
Amônia tóxica (ppm)	< 0,037
Condutividade (µS)	918
Dureza total (ppm de CaCO ₃)	50
Nitrito (ppm)	0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	0,59
pH	7,4
Salinidade (ppt)	0,5
Temperatura (°C)	22,8

Tabela 11 – Resultados do oxigênio dissolvido, pH e temperatura no experimento com amostra durante 96hpf. Amostra coletada na lagoa Imboassica.

	Oxigênio (mg/l)	pH	Temperatura (°C)
Efluente sem diluição	3,8 ±1,2	7,1 ±0,1	25 ±1
CTRL	8,9 ±0,2	7,1 ±0,2	25 ±1
C40	6,8 ±0,3	7,2 ±0,1	25 ±1
C60	6,1 ±0,5	7,2 ±0,1	25 ±1
C80	5,4 ±0,5	7,3 ±0,1	25 ±1

Embora o efluente apresente condições parecidas com o efluente coletado no canal Macaé-Campos, as observações sobre as alterações morfológicas não indicam a presença de agentes tóxicos. Os embriões se desenvolveram normalmente, com morfologia muito similar ao controle negativo. Não houve mortes e não houve alterações morfológicas (FIGURA 21). Como não houve alterações no desenvolvimento

embrionário, a realização da identificação e quantificação de metais não foi feita, assim como o qRT-PCR em tempo real.



Figura 27 – Experimento realizado com efluente coletado na Lagoa Imboassica (22/07/2014). (A) Controle negativo. (B) Diluição C60. (C) Diluição C80. As imagens A, B e C apresentam o mesmo estágio de desenvolvimento, entre 72 e 96 hpf. O efluente não apresentou agentes tóxicos capazes de alterar a morfologia dos embriões.

Discussão

Parâmetros físico-químicos dos efluentes

Assim como os ecossistemas recebem descartes de efluentes com substâncias potencialmente tóxicas, existem também muitos fatores que afetam a toxicidade dessas substâncias (Landis e Yu, 2003). Alguns desses fatores são abióticos. Dentre eles temos o pH, a temperatura, o oxigênio, a dureza da água e a salinidade capazes de modificar respostas toxicológicas ou de serem mudados por eles (Dave, 1985; Hall e Anderson, 1995; Laskowski *et al.*, 2010).

No presente trabalho os resultados obtidos mostraram pH neutro (entre 7 – 7,2) para ambas as amostras coletadas no canal Macaé-Campos, enquanto o pH do meio E3 estava um pouco mais ácido (pH = 6,5). O peixe-zebra em seu ambiente natural pode ser encontrado em locais onde o pH pode variar entre 6,6 a 8,2 (McClure *et al.*, 2006). O pH em meio ácido, sem considerar a adição de substâncias tóxicas, por si só é capaz de alterar a fisiologia de peixes (Kwong *et al.*, 2014). Em *Danio rerio*, experimentos realizados por Dave (1985) sugerem que o pH ideal para o desenvolvimento dos embriões está entre 7 e 6, entretanto, em 6,2 os embriões eclodiram mais rápido; o pH

abaixo de 6 promove atrasos na eclosão. Dave (1985) também avaliou a influência do pH na toxicidade de alumínio, Cd e Fe. Os resultados mostraram que o alumínio e o Cd são mais tóxicos em pH básico, diferentemente do ferro que é mais tóxico em pH ácido. Em experimentos com Cu, Pb, Cd e Ni, Komjarova e Blust (2009) observaram que em adultos de *Danio rerio* a absorção de Cd e Ni aumentam em pH básico; e que a absorção mais elevada para Cu e Pb ocorreram quando o pH foi neutro, devido a alterações na especiação de Cu e Pb. Variações de pH também podem ser promovidas pelas variações de temperatura. Por exemplo, o pH de uma água neutra (pH = 7 e temperatura = 25°C) se acidifica com o aumento de temperatura e se torna básica com a diminuição da temperatura (Nikinmaa, 2014).

Os organismos possuem um limite de tolerância à temperatura. Dentro dessa tolerância térmica, a temperatura pode agir como um fator controlador através de seus efeitos no metabolismo (Brett, 1964). Alguns efeitos tóxicos podem ser intensificados pelo aumento da temperatura, por exemplo, quando substâncias tóxicas atuam sobre enzimas celulares envolvidas no metabolismo energético ou capazes de alterar taxas de absorção; assim como inibição da troca gasosa na respiração nas brânquias de peixes (Cairns *et al.*, 1975). O aumento da temperatura também pode provocar aumento da sensibilidade da glicosidase intestinal de alevinos de algumas espécies de peixes a ação de íons de Cu e Zn (Golovanova e Golovanov, 2014). Neste trabalho, a temperatura dos efluentes coletados no canal Macaé-Campos apresentou valor de 25°C, entretanto, os ensaios toxicológicos foram realizados a temperatura de 28°C. Essa mudança foi realizada devido ao desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* ter uma temperatura ideal de incubação (Kimmel *et al.*, 1995). Desta forma, não se assumiu o fator temperatura como causador de distúrbios no metabolismo do peixe-zebra. Além disso, a temperatura também pode influenciar no consumo de oxigênio dissolvido pelo organismo. Krishnamoorthy *et al.* (2008) observaram que o aumento da temperatura provocou aumento da produção de amônia e do consumo de oxigênio dissolvido pela espécie de peixe *Alepes djidaba*. Em ensaios de toxicidade aguda com efluentes, o oxigênio dissolvido pode diminuir por condições de redução e/ou pela alta atividade de microrganismos (Kuster e Altenburger, 2008).

Como os efluentes coletados no canal Macaé-Campos foram diluídos em meio E3, os valores de oxigênio dissolvido realizados com o efluente coletado no mês de abril em cada tratamento apresentaram valores ≥ 5 mg/L; o menor valor encontrado foi

em C80. Além disso, os ensaios foram desenhados para se enquadrar no sistema semi-estático, ou seja, a cada 24h as soluções de cada tratamento foram renovadas. Conseqüentemente, as alterações morfológicas presentes nos embriões não são resultados produzidos pela concentração de oxigênio nas amostras. A concentração de oxigênio necessário nos ensaios de toxicidade para considerar o desenvolvimento normal de embriões de *Danio rerio* foi estimada em valores $\geq 5,1$ mg/L (Kuster e Altenburger, 2008). De acordo com Strecker *et al.* (2011) o consumo de oxigênio por um embrião é de 0,022 mg nas primeiras 72hpf.

Os efluentes coletados no canal Macaé-Campos também apresentaram águas leves como característica. Essa condição para alguns metais pode promover aumento da toxicidade em baixas concentrações. Utilizando a espécie *Capoeta fusca*, Ebrahimpour *et al.* (2010) identificaram que em relação à dureza da água, o cobre (Cu) ou zinco (Zn) necessitam de concentrações menores para causar toxicidade em águas leves. O oposto acontece em águas duras. Pascoe *et al.* (1986) utilizando o peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) obteve resultados sobre a influência da dureza da água em relação a toxicidade de Cd. Os resultados indicam que a concentração necessária de Cd para produzir toxicidade em águas duras, é preciso o dobro do valor encontrado para o mesmo tipo de ensaio usando águas leves, tanto em ensaios de 48h como de 96h.

Além do parâmetro dureza da água, outro fator abiótico que interfere na absorção de metais é a salinidade. Observando os resultados encontrados nas amostras de efluentes do canal Macaé-Campos, percebemos que a salinidade apresentou diferenças entre as duas amostras. Sendo a amostra do mês de outubro com maior quantidade de sais. Essas condições se comparadas com os resultados de Komjarova e Blust (2009) abrem espaço para questionamentos sobre a influência do Na e Ca na absorção de outros metais pelos embriões de *Danio rerio*. A salinidade também mostrou ser capaz de influenciar na toxicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Shukla *et al.* (2007) utilizando a espécie de peixe *Tilapia mossambica* encontrou diferença significativa de HPAs em diferentes concentrações de salinidade (0‰, 15‰ e 30‰). A maior quantidade de HPAs solúveis foram encontradas em 0% e foi diminuindo em 15% e menos ainda em 30%. A maior quantidade de moléculas foram de baixo peso molecular com dois (naftalenos) ou três (fenantrenos) anéis aromáticos. A hipótese que melhor explica essa condição é encontrada na solubilidade de

contaminantes orgânicos hidrofóbicos que é baixa em águas com salinidade alta (Schlautman *et al.*, 2004).

No que se refere aos metais, Shek e Chan (2015) perceberam que em tilápias (*Oreochromis niloticus*; *O. aureus*) a absorção de Cd e Zn diminuiu com o aumento da salinidade. A absorção de Cu teve seus níveis aumentados. Komjarova e Blust (2009) identificaram que Na e Ca interferem na absorção de metais em adultos de peixe-zebra. Os resultados mostraram que a adição de Ca ao meio suprimiu o efeito de absorção de Cd nas brânquias. O valor mais alto da taxa de absorção de Cu e chumbo e a mais baixa de níquel foram observados com concentração de 0,5 mM Ca. O aumento da concentração de Na de 0,5 a 8 mM diminuiu a captura de Cd e Ni nas brânquias. Concentrações altas e baixas de Na na água suprimiram o efeito de captura do Pb.

Metais pesados

A solubilidade do metal em água é um fator que influencia na disponibilidade e na absorção de metais (Cornelis e Nordberg, 2007). Desta forma, dentre os metais encontrados nos efluentes do canal Macaé-Campos, as concentrações de boro, cromo, ferro e estrôncio apresentaram concentrações insuficientes para provocar alterações no embrião (Dave, 1985; Rowe e Eckhert, 1999; Domingues *et al.*, 2010; Pasqualetti *et al.*, 2013). O manganês superou o limite de classificação de qualidade da água classe 1 (CONAMA, 2005) em ambas as amostras de efluentes. Entretanto, não foram encontradas publicações sobre a toxicidade aguda do manganês em peixes.

A concentração de Cu em ambas as amostras do canal Macaé-Campos apresentaram valores $>1 \mu\text{g/l}$ e $<10 \mu\text{g/l}$, indicando que embora não seja suficiente para causar mortalidade, sua concentração contribui para o retardo no desenvolvimento do embrião. Dave e Xiu (1991) mostraram que 100% dos embriões de *Danio rerio* morreram em 24 hpf em exposição a concentração de $128 \mu\text{g/l}$ de Cu; e menos de 50% eclodiram em concentrações menores até $1 \mu\text{g/l}$. O autor ainda afirma que a exposição ao Cu causou maior sensibilidade na eclosão do que em relação a mortalidade. Johnson *et al.* (2007) utilizando diferentes concentrações de Cu entre 50 e $100 \mu\text{g/l}$ também identificaram aumento da mortalidade, diminuição do sucesso de eclosão e redução na quantidade de neuromastos.

Para o chumbo nas amostras de efluentes não foram encontrados valores suficientes para causar alterações no desenvolvimento de *Danio rerio*. Os efeitos da

toxicidade causada pelo chumbo só conseguiriam ser observadas caso a concentração estivesse acima de 20 µg/l (Dave e Xiu, 1991).

As concentrações de zinco identificada nos efluentes do canal Macaé-Campos foram <50 µg/l, indicando que o Zn não influenciou nas alterações ocorridas nos embriões de *Danio rerio*. Alsop e Wood (2011) identificaram que a LC50 de Zn em larvas de *Danio rerio* possui valor de 2535 µg/l em águas leves.

Analisar informações individuais dos metais presentes nos efluentes pode nos indicar um caminho para explicar os fenômenos ocorridos na toxicidade. Porém, esses metais estão misturados em uma única solução. Os comportamentos dessa mistura de compostos químicos podem estar sendo influenciadas por interações sinérgica, antagônica, de potenciação, de adição ou não há interação alguma entre eles (Rand, 1995). Por isso, utilizar apenas a identificação de metais na amostra e associá-las a outros dados já divulgados cientificamente, não garante uma interpretação real do que está acontecendo. Por este motivo, a utilização de biomarcadores pode complementar os resultados, indicando se houve alteração na expressão do gene *metalotioneína2*. Os resultados encontrados na expressão de *mt2* dos embriões expostos ao efluente coletado no canal Macaé-Campos no mês de abril (FIGURA 15), não apresentaram valores de aumento em relação ao controle. Ao contrário, nas diluições C60 e C80 houve uma leve diminuição. Uma hipótese levantada por esse trabalho é de que essa leve inibição do gene *mt2* pode ter sido promovido pela influência dos resultados encontrados no aumento da expressão do gene *cyp1a1*. Uma vez que ambos atuam como reguladores de metais pesados e hidrocarbonetos, respectivamente, durante a fase embrionária (Chen *et al.*, 2004; Goldstone *et al.*, 2010). Entretanto, são necessários novos experimentos para avaliar essa condição.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Como os efluentes usados nos experimentos são misturas de rejeitos doméstico e possivelmente industrial não é prático identificar todas as substâncias químicas e suas toxicidades (Ryker e Small, 2008). Conseqüentemente, o experimento realizado assumiu a combinação de todas as substâncias químicas presentes no efluente como sendo um único agente tóxico (USEPA, 1986). Os efluentes formados por misturas químicas das quais não se sabe a composição e origem são soluções complexas. Com essa mistura de substância é impossível identificar qual composto químico está

contribuindo para a toxicidade de toda a mistura ou como duas ou mais substâncias trabalham juntas para produzir toxicidade (Kortenkamp *et al.*, 2010). Embora ainda não seja possível determinar qual ou quais substâncias estão atuando na toxicidade, através da expressão de biomarcadores, conseguimos identificar o grupo ao qual tais agentes tóxicos pertencem. No caso do gene *cyp1a1*, na literatura alguns estudos indicam que sua expressão aumenta quando o organismo se torna exposto a soluções contendo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e poluentes organoclorados. Assim, dos resultados encontrados sobre a expressão do gene *cyp1a1* em peixe-zebra, apenas o efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos apresentou aumento (FIGURA 14). Os resultados mostraram ainda que quanto maior a porcentagem de efluente na solução, maior o aumento da expressão (C80 apresentou três vezes mais) quando comparado ao controle. Comparando com outros estudos, percebemos que as respostas dos efeitos causados pela toxicidade no efluente foram parecidas. Como em Andreasen *et al.* (2002) que realizaram ensaios com embriões de *Danio rerio* em que foram expostos a concentração de 0,5 µg/l de 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Os resultados mostraram um aumento de aproximadamente 50 vezes na expressão de mRNA de *cyp1a*. O composto também originou a formação de edemas no pericárdio e curvatura na notocorda. Outro exemplo, Liu *et al.* (2014) utilizaram 64 µg/l de 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126, pureza >99%) em experimentos de 96hpf. As respostas alcançadas mostraram que aproximadamente 70% dos embriões expostos apresentaram formação de edema no pericárdio. A expressão de mRNA de *cyp1a* mostrou um aumento de 46,98 vezes em relação ao controle. Em relação aos HPAs, Huang *et al.* (2012) utilizaram o composto químico benzo[a]pireno. A exposição de 72h de benzo[a]pireno provocou disfunções cardíacas e alterações na morfologia do coração, como edemas no pericárdio em embriões de peixe-zebra. A expressão do gene *cyp1a* apresentou aumento de 5 vezes mais que o controle com a exposição de 0.2 nM de benzo[a]pireno. Desta forma, com base nas alterações morfológicas e na resposta da expressão do biomarcador é possível afirmar a existência de agentes tóxicos no efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. O biomarcador *cyp1a1* mostrou ser uma ferramenta capaz de auxiliar na identificação do grupo aos quais os agentes tóxicos pertencem. Assim reconhecemos a toxicidade de HPAs na amostra.

Alterações morfológicas

O efeito provocado por um agente tóxico pode ser medido e relacionado à concentração em que os organismos modelo estavam expostos (Leblanc, 2004). Desta forma, as características adotadas nos experimentos deste trabalho foram mortalidade, formação de edemas e eclosão nos embriões de *Danio rerio*.

Nos experimentos realizados com o efluente coletado no mês de abril no canal Macaé-Campos, a mortalidade foi uma característica que esteve presente nos três ensaios toxicológicos (FIGURA 14). Medir a mortalidade nos permite avaliar o efeito tóxico de uma substância considerando a concentração e o tempo de exposição ao organismo estudado (Nikinmaa, 2014). Como os ensaios foram feitos em momentos diferentes, quando comparamos os resultados da mortalidade nos três ensaios vemos que o número de embriões atingidos diminuiu. Mesmo a amostra de efluente estando conservada a temperatura abaixo de 10°C sem congelamento, os agentes tóxicos presentes na amostra de efluente foram perdendo a sua toxicidade ao passar do tempo. Embora não possamos dizer qual ou quais substâncias causaram a mortalidade nos embriões, com a expressão do biomarcador *cyp1a1* (FIGURA 15) conseguimos afirmar que existe interação entre os HPAs disponíveis com o organismo. Como os HPAs sofrem degradação por fatores abióticos como pH, níveis de oxigênio, disponibilidade de nutrientes (Doyle *et al.*, 2008) e por ação de microrganismos (Volkering e Breure, 2003), é provável que sua degradação no efluente permitiu a diminuição da toxicidade na amostra. Consequentemente, o número de embriões mortos também diminuiu.

A mortalidade também aconteceu em momentos diferentes nos ensaios utilizando o efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos. No primeiro ensaio (FIGURA 8) as mortes nas diluições C60 e C80 foram gradativas em 24, 48, 72 e 96hpf. Esse acontecimento se observado junto com o processo de eclosão dos embriões, percebemos que em C80 de 42% de embriões vivos apenas 6% conseguiram eclodir (FIGURA 9). Na diluição C60 não foi diferente, de 47% de embriões vivos 33% eclodiram (FIGURA 9). Isso indica que a toxicidade afetou os estágios iniciais impedindo o desenvolvimento do embrião. Semelhante às respostas encontradas, Wu *et al.* (2014) realizou experimentos com amostras de águas pluviais coletadas em eventos de tempestades de rodovias em Shangai. Os experimentos foram realizados com embriões de *Danio rerio* durante 96h de exposição. As análises químicas das amostras foram comparadas com critério de concentração máxima (representa toxicidade aguda)

e critério de concentração contínua (representa toxicidade crônica) (U.S.EPA, 2009). Os resultados da análise química apresentaram concentrações de metais pesados e de HPAs. Entretanto, somente os metais ultrapassaram o valor do critério de concentração contínua. Os resultados apresentaram mortalidade, alteração na frequência cardíaca, alteração no movimento espontâneo, atraso na eclosão e teratogênese no desenvolvimento de peixe-zebra. No segundo ensaio (FIGURA 10), C60 e C80 tiveram um momento específico de mortalidade de embriões, que aconteceu entre 72-96hpf. Na diluição C60, em 72hpf, dos 92% de embriões vivos 37% apresentaram a formação de edema no pericárdio. Em C80, em 72hpf, temos 97% de embriões vivos e 52 % de embriões com edema no pericárdio (FIGURA 11). Quando observado o ensaio em 96hpf, C60 apresentou mortalidade de 68% e C80 apresentou 25% (FIGURA 10). Esse acontecimento pode estar associado a falhas no sistema cardíaco, uma vez que em 72hpf os embriões já apresentavam a formação de edemas no pericárdio. A formação de edemas, diferente da mortalidade, é um fenótipo subletal causado por falhas no sistema cardíaco (Lanham *et al.*, 2014). Defeitos na função cardíaca podem aparecer desde a ausência de batimentos no coração, como arritmia. Conseqüentemente, alterando o processo de fluxo de sangue no corpo do embrião (Miura e Yelon, 2011).

O sangue é fundamental para o transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos de produtos dentro do organismo (Strilic *et al.*, 2010). Uma vez que não haja funcionamento regular dessas funções, o embrião pode não conseguir sobreviver. Incardona *et al.* (2004) obteve resultados semelhantes com a exposição de embriões de *Danio rerio* a diferentes concentrações de misturas de HPAs. Dentre as características observadas foram registradas disfunção cardíaca, edema, curvatura espinhal e redução do tamanho da mandíbula e outras estruturas craniofaciais. Entretanto, novos experimentos são necessários para comprovar a hipótese de que os resultados encontrados com o efluente coletado em abril no canal Macaé-Campos foram de fato provocados por HPAs. Em relação à eclosão, C60 teve 49% de embriões eclodidos e C80 nenhum embrião alcançou este estágio. A mortalidade em 96hpf no terceiro e último ensaio foram gradativas e apresentaram menos de 20% nas diluições (FIGURA 12). Das demais características, edema no pericárdio e eclosão, somente C80 foi diferente estatisticamente do CTRL, mostrando que a amostra ainda tinha substâncias capazes de alterar o desenvolvimento do embrião (FIGURA 13).

Em relação aos ensaios toxicológicos realizados com a amostra de efluente coletado em outubro no canal Macaé-Campos, as mortes foram influenciadas pela baixa oxigenação da amostra (FIGURA 26). A concentração de oxigênio no primeiro ensaio nas diluições C30, C40 e 60 foram respectivamente de $3,6 \pm 1,7$, $2,9 \pm 1,7$ e $2,9 \pm 1,7$ (TABELA 7). Strecker *et al.* (2011) observou que o desenvolvimento de *Danio rerio* em soluções com oxigênio entre 3,0 e 2,0 mg/L, os embriões sofrem atrasos no desenvolvimento e nenhuma alteração patológica. O autor ainda diz que soluções com concentrações abaixo de 0,88 mg/L de oxigênio dissolvido apresentaram 100% de mortalidade. Com o efluente coletado no canal Macaé-Campos em outubro, nas FIGURAS 19 e 20, percebemos apenas o atraso no desenvolvimento dos embriões em 24 e 96hpf. O segundo experimento, o efluente foi aerado e sua concentração nas diluições foram acima de 5,0 mg/L (TABELA 8). As respostas das alterações fenotípicas ainda foram com base atraso do desenvolvimento, entretanto, os embriões conseguiram avançar nos estágios e houve apenas 15% de mortalidade em C60 (FIGURA 22 e 23). As diluições C40 e C30 tiveram 5% e 20% de embriões eclodidos, respectivamente. Na diluição C60 os embriões não alcançaram o estágio de eclosão (FIGURA 23). No terceiro ensaio, o efluente foi apenas filtrado, diminuindo partículas e microrganismos livres na solução. As diluições C30, C40 e C60 apresentaram concentrações de $4,5 \pm 0,8$, $3,9 \pm 1,0$, $3,6 \pm 1,7$, respectivamente. Novamente, o desenvolvimento foi afetado apenas com o atraso no desenvolvimento, apresentando alta mortalidade (70% de mortalidade) e nenhum embrião desenvolvido a ponto de eclodir em C60 (FIGURA 25). Comparando a mortalidade nos três ensaios (FIGURA 26), utilizando o efluente coletado em outubro no canal Macaé-Campos, fica evidente que a oxigenação foi um fator importante e que pode ter sido o principalmente agente tóxico presente na amostra.

O ensaio feito com o efluente coletado na lagoa Imboassica não apresentou nenhum efeito. Não houve atraso no desenvolvimento, assim como não houve mortes e nem mudanças fenotípicas (FIGURA 27). Desta forma, as substâncias presentes no efluente não foram capazes de apresentar alterações no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio*. A amostra assim que coletada possuía oxigenação abaixo de 0,88 mg/L, o que seria letal para o embrião (Strecker *et al.*, 2011). Entretanto, como as diluições foram feitas com o meio E3 e o mesmo apresentou oxigenação alta, o oxigênio

disponível em C80 foi maior que 5 mg/L, ideal para o desenvolvimento normal do embrião.

Conclusão

O estudo realizado através desta pesquisa destaca os efeitos, causado pelo descarte de efluentes sem tratamento que são lançados nos corpos hídricos na cidade de Macaé. Sobre a biota, a conclusão que chegamos foi que existem substâncias com potencial tóxico sendo lançadas no canal Macaé-Campos. Essas substâncias são capazes de alterar o desenvolvimento e provocar mortalidade ainda nos primeiros estágios embrionários. A espécie *Danio rerio* também se mostrou um modelo sensível à toxicidade e o uso de biomarcadores auxiliou na identificação de HPAs atuando no metabolismo do peixe-zebra. A lagoa de Imboassica, no ponto onde foi testado, não apresentou substâncias tóxicas capaz de alterar o desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio*.

Referências

- Abiquim. (2014). "O desempenho da indústria química brasileira em 2014." from <http://www.abiquim.org.br/pdf/livreto-de-dados-2014-paginas.pdf>.
- ABNT (2007). Preservação e preparo de amostras. Ecotoxicologia aquática. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15469-2007**: 7p.
- ABNT (2011). Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. Ecotoxicologia aquática. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088-2011**: 22p.
- Albers, P. H. (2003). Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Handbook of ecotoxicology, 2nd. D. J. Hoffman. Boca Raton, FL, Lewis Publishers: 341-371.
- Alsop, D. and C. M. Wood (2011). "Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals." Aquat Toxicol **105**(3-4): 385-393.
- Birge, W. J., J. A. Black and A. G. Westerman (1985). "Short-term fish and amphibian embryo-larval tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents: Complex mixtures." Environmental Toxicology and Chemistry **4**(6): 807-821.
- Boffetta, P., N. Jourenkova and P. Gustavsson (1997). "Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." Cancer Causes Control **8**(3): 444-472.
- Bolt, H. M. a. P. H. R. (2008). Generation of Reactive Intermediates by Cytochromes P450. Cytochromes P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics. C. Ioannides, Royal Society of Chemistry. **3**.
- Bradley, T. J. (2009). Hyper regulators: life in fresh water. Animal osmoregulation, Oxford University Press.
- Brett, J. R. (1964). "The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon." Journal of the Fisheries Research Board of Canada **21**(5): 1183-1226.
- Brown, A. R., D. J. Hosken, F. Balloux, L. K. Bickley, G. LePage, S. F. Owen, M. J. Hetheridge and C. R. Tyler (2009). "Genetic variation, inbreeding and chemical exposure--combined effects in wildlife and critical considerations for ecotoxicology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1534): 3377-3390.
- Cairns, J., Jr., A. G. Heath and B. C. Parker (1975). "Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms." J Water Pollut Control Fed **47**(2): 267-280.
- Casadei, R., M. C. Pelleri, L. Vitale, F. Facchin, L. Lenzi, S. Canaider, P. Strippoli and F. Frabetti (2011). "Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish." Gene Expr Patterns **11**(3-4): 271-276.
- Chan, K. M., L. L. Ku, P. C. Chan and W. K. Cheuk (2006). "Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions." Mar Environ Res **62** **Suppl**: S83-87.
- Chen, W. Y., J. A. John, C. H. Lin, H. F. Lin, S. C. Wu, C. H. Lin and C. Y. Chang (2004). "Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish." Aquat Toxicol **69**(3): 215-227.
- Coimbra, R. S. C., Saraiva, V. B., Oliveira, M. M. (2013). BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO PESCADO NA LAGOA IMBOASSICA, MACAÉ, RJ, IFF.
- CONAMA, R. (2005). "357, de 17 de Março de 2005." Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA **357**.
- CONAMA, R. (2011). "430, de 13 de Maio de 2011." Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA **430**.
- Cornelis, R. and M. Nordberg (2007). "General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation." Handbook on the toxicology of metals: 11-38.
- Coyle, P., J. C. Philcox, L. C. Carey and A. M. Rofe (2002). "Metallothionein: the multipurpose protein." Cell Mol Life Sci **59**(4): 627-647.

- Dave, G. (1985). "The influence of pH on the toxicity of aluminum, cadmium, and iron to eggs and larvae of the zebrafish, *Brachydanio rerio*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **10**(2): 253-267.
- Dave, G. and R. Q. Xiu (1991). "Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*." *Arch Environ Contam Toxicol* **21**(1): 126-134.
- De Montellano, P. R. O. (2005). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, Springer Science & Business Media.
- de Saneamento Ambiental, C. d. T. (1980). Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. *Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo*, CETESB.
- Dias, R. (2013). "Instituições e desenvolvimento territorial: um estudo a partir do caso do arranjo produtivo de petróleo e gás natural localizado em Macaé-Brasil." *EURE (Santiago)* **39**: 141-171.
- Dietrich, M. R., R. A. Ankeny and P. M. Chen (2014). "Publication trends in model organism research." *Genetics* **198**(3): 787-794.
- Domingues, I., R. Oliveira, J. Lourenco, C. K. Grisolia, S. Mendo and A. M. Soares (2010). "Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **152**(3): 338-345.
- Donkin, S. G., D. L. Ohlson and C. M. Teaf (2003). Properties and Effects of Metals. *Principles of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc.: 325-344.
- Doyle, E., L. Muckian, A. M. Hickey and N. Clipson (2008). "Microbial PAH degradation." *Adv Appl Microbiol* **65**: 27-66.
- Durnam, D. M. and R. D. Palmiter (1987). "Analysis of the detoxification of heavy metal ions by mouse metallothionein." *Experientia Suppl* **52**: 457-463.
- Dwivedi, P. D., M. Das and S. K. Khanna (1998). "Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats." *Food Chem Toxicol* **36**(5): 437-444.
- Ebrahimpour, M., H. Alipour and S. Rakhshah (2010). "Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish." *Toxicol Ind Health* **26**(6): 361-365.
- Eisler, R. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Handbook of Chemical Risk Assessment*. Boca Raton, FL, Lewis Publishers. **Vol. 2**: 1343-1412.
- Esteves, F. (1998). "Lagoa Imboassica: impactos antrópicos, propostas mitigadoras e sua importância para a pesquisa ecológica. In Esteves, FA. (ed.), *Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*." *Núcleo de Pesquisa Ecológicas de Macaé (NUPEM) – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil* **1a ed.**(capítulo 6.3): 401-429.
- Fowler, B. A., M. H. Whittaker, M. Lipsky, G. Wang and X. Q. Chen (2004). "Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview." *Biometals* **17**(5): 567-568.
- Franklin, M. R. and G. S. Yost (2003). Biotransformation: A Balance between Bioactivation and Detoxification. *Principles of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc.: 57-86.
- Garty, M., K. L. Wong and C. D. Klaassen (1981). "Redistribution of cadmium to blood of rats." *Toxicol Appl Pharmacol* **59**(3): 548-554.
- Gelboin, H. V. (1980). "Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes." *Physiol Rev* **60**(4): 1107-1166.
- Gibson, G. G. and P. Skett (2001). *Introduction to drug metabolism*, Nelson Thornes.
- Goksøyr, A. and L. Förlin (1992). "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." *Aquatic Toxicology* **22**(4): 287-311.
- Goldstone, J. V., A. Hamdoun, B. J. Cole, M. Howard-Ashby, D. W. Nebert, M. Scally, M. Dean, D. Epel, M. E. Hahn and J. J. Stegeman (2006). "The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome." *Dev Biol* **300**(1): 366-384.

- Goldstone, J. V., A. G. McArthur, A. Kubota, J. Zanette, T. Parente, M. E. Jonsson, D. R. Nelson and J. J. Stegeman (2010). "Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish." *BMC Genomics* **11**: 643.
- Golovanova, I. L. and V. K. Golovanov (2014). "[Effect of rate of water temperature increase on sensitivity of fish digestive glycosidases to action of copper and zinc]." *Zh Evol Biokhim Fiziol* **50**(1): 25-30.
- Guiney, P. D., M. K. Walker, J. M. Spitsbergen and R. E. Peterson (2000). "Hemodynamic dysfunction and cytochrome P4501A mRNA expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during embryonic stages of lake trout development." *Toxicol Appl Pharmacol* **168**(1): 1-14.
- Hall, L. W., Jr. and R. D. Anderson (1995). "The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota." *Crit Rev Toxicol* **25**(4): 281-346.
- Hamer, D. H. (1986). "Metallothionein." *Annu Rev Biochem* **55**: 913-951.
- Hamscher, G. (2006). Veterinary Pharmaceuticals. *Organic Pollutants in the Water Cycle*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 99-120.
- Hartwell, L., L. Hood and M. L. Goldberg (2011). Genomes and Proteomes. *Genetics: from genes to genomes*, Granite Hill Publishers.
- Hill, A. J., S. M. Bello, A. L. Prash, R. E. Peterson and W. Heideman (2004). "Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages." *Toxicol Sci* **78**(1): 78-87.
- Hill, A. J., H. Teraoka, W. Heideman and R. E. Peterson (2005). "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity." *Toxicol Sci* **86**(1): 6-19.
- Hodgson, E. (2004). Introduction to Toxicology. *A Textbook of Modern Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc.: 1-12.
- Hoffman, E. J., G. L. Mills, J. S. Latimer and J. G. Quinn (1984). "Urban runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons to coastal waters." *Environ Sci Technol* **18**(8): 580-587.
- Hogstrand, C., P. M. Verbost, S. E. Bonga and C. M. Wood (1996). "Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport." *Am J Physiol* **270**(5 Pt 2): R1141-1147.
- Hook, G. L. (2008). "Toxicology of Metals." *Toxicology Principles for the Industrial Hygienist*: 209.
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G.-J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.-H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimer, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Urun, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberlander, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nusslein-Volhard, T. J. P.

- Hubbard, H. R. Crolius, J. Rogers and D. L. Stemple (2013). "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* **496**(7446): 498-503.
- Incardona, J. P., T. K. Collier and N. L. Scholz (2004). "Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." *Toxicol Appl Pharmacol* **196**(2): 191-205.
- InterTV (2013). Caminhões são flagrados jogando esgoto em rio de Macaé, no RJ. G1 Região dos Lagos, globo.com.
- James, R. C., S. M. Roberts and P. L. Williams (2003). *General Principles of Toxicology. Principles of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc.: 1-34.
- Jarup, L., A. Rogenfelt, C. G. Elinder, K. Nogawa and T. Kjellstrom (1983). "Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure." *Scand J Work Environ Health* **9**(4): 327-331.
- Jeffries, M. K., A. E. Stultz, A. W. Smith, J. M. Rawlings, S. E. Belanger and J. T. Oris (2014). "Alternative methods for toxicity assessments in fish: comparison of the fish embryo toxicity and the larval growth and survival tests in zebrafish and fathead minnows." *Environ Toxicol Chem* **33**(11): 2584-2594.
- Jezierska, B., K. Lugowska and M. Witeska (2009). "The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)." *Fish Physiol Biochem* **35**(4): 625-640.
- Johnson, A., E. Carew and K. A. Sloman (2007). "The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos." *Aquat Toxicol* **84**(4): 431-438.
- Johnson, D. R. and E. C. Foulkes (1980). "On the proposed role of metallothionein in the transport of cadmium." *Environ Res* **21**(2): 360-365.
- Kagi, J. H. (1991). "Overview of metallothionein." *Methods Enzymol* **205**: 613-626.
- Kefalas, V. and N. H. Stacey (1991). "Potentiating effects of chlorinated hydrocarbons on carbon tetrachloride toxicity in isolated rat hepatocytes and plasma membranes." *Toxicol Appl Pharmacol* **109**(1): 171-179.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Klaassen, C. D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*, McGraw-Hill New York (NY).
- Komjarova, I. and R. Blust (2009). "Effects of Na, Ca, and pH on the Simultaneous Uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the Zebrafish *Danio rerio*: A Stable Isotope Experiment." *Environmental Science & Technology* **43**(20): 7958-7963.
- Kortenkamp, A., R. Altenburger, C. Van Gestel, M. Jonker, J. Kammenga, R. Laskowski and C. Svendsen (2010). "Toxicity from combined exposure to chemicals." *Mixture Toxicity. Linking Approaches from Ecological and Human Toxicology*: 95-119.
- Krishnamoorthy, R., H. E. Syed Mohamed and P. Shahul Hameed (2008). "Temperature effect on behaviour, oxygen consumption, ammonia excretion and tolerance limit of the fish fingerlings of *Alepes djidaba*." *J Environ Sci Eng* **50**(3): 169-174.
- Kszos, L. A., J. J. Beauchamp and A. J. Stewart (2003). "Toxicity of lithium to three freshwater organisms and the antagonistic effect of sodium." *Ecotoxicology* **12**(5): 427-437.
- Kuster, E. and R. Altenburger (2008). "Oxygen decline in biotesting of environmental samples-- is there a need for consideration in the acute zebrafish embryo assay?" *Environ Toxicol* **23**(6): 745-750.
- Kwong, R. W., Y. Kumai and S. F. Perry (2014). "The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system." *The Journal of experimental biology* **217**(5): 651-662.
- Lammer, E., G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger and T. Braunbeck (2009). "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?" *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**(2): 196-209.
- Landis, W. G. and M.-H. Yu (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*, Crc Press.

- Lanham, K. A., J. Plavicki, R. E. Peterson and W. Heideman (2014). "Cardiac myocyte-specific AHR activation phenocopies TCDD-induced toxicity in zebrafish." *Toxicol Sci* **141**(1): 141-154.
- Laskowski, R., A. J. Bednarska, P. E. Kramarz, S. Loureiro, V. Scheil, J. Kudłek and M. Holmstrup (2010). "Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors — A meta-analysis and case studies." *Science of The Total Environment* **408**(18): 3763-3774.
- Leaver, M. J. (1996). Principles governing the use of cytochrome P4501A1 measurement as a pollution monitoring tool in the aquatic environment. *Toxicology of Aquatic Pollution*. E. W. Taylor. New York, Cambridge University Press: 267-278.
- Leblanc, G. A. (2004). Acute Toxicity. *A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson, John Wiley & Sons, Inc.: 1-12.
- Lee, R. F., Sauerhebe, R. and G. H. Dobbs (1972). "Uptake, Metabolism and Discharge of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Marine Fish." *Marine Biology* **17**(3): 201-&.
- Lewis, D. F. (1996). *Guide to Cytochromes: Structure and Function*, CRC Press.
- Lewis, D. F. (2000). "On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism." *Biochem Pharmacol* **60**(3): 293-306.
- Li, Z., J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, A. de Raadt, H. Griengl and B. Witholt (2002). "Oxidative biotransformations using oxygenases." *Curr Opin Chem Biol* **6**(2): 136-144.
- Liedtke, A., J. Muncke, K. Rufenacht and R. I. Eggen (2008). "Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT." *Environ Toxicol* **23**(1): 59-67.
- Lusin, T. T., A. Mrhar, B. Stieger, A. Kristl, K. Berginc and J. Trontelj (2015). "Efflux and uptake transporters involved in the disposition of bazedoxifene." *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*.
- Machado, P. V. L. (2012). *Estudo dos Aspectos Qualitativos da Água e dos Sedimentos na Bacia Hidrográfica da Lagoa de Imboacica e Aplicação de Índices de Qualidade* IFF.
- Madden, E. F., M. Akkerman and B. A. Fowler (2002). "A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52 and human HK-2 kidney cell lines following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination." *J Biochem Mol Toxicol* **16**(1): 24-32.
- Manoli, E. and C. Samara (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **18**(6): 417-428.
- McClure, M., P. McIntyre and A. McCune (2006). "Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*." *Journal of Fish Biology* **69**(2): 553-570.
- McGeer, J. C., C. Szebedinszky, D. Gordon McDonald and C. M. Wood (2000). "Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation." *Aquat Toxicol* **50**(3): 245-256.
- Mikalsen, A., J. Alexander, H. Wallin, M. Ingelman-Sundberg and R. A. Andersen (1991). "Reductive metabolism and protein binding of chromium(VI) by P450 protein enzymes." *Carcinogenesis* **12**(5): 825-831.
- Miura, G. I. and D. Yelon (2011). "A guide to analysis of cardiac phenotypes in the zebrafish embryo." *Methods Cell Biol* **101**: 161-180.
- Molisani, M. M., F. d. A. Esteves, L. D. d. Lacerda and C. E. d. Rezende (2013). "Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na Bacia de Campos." *Química Nova* **36**: 27-66.
- Mozeto, A. A., Zagatto, P. A. (2008). Cap. 2 - Introdução de agentes químicos no ambiente. *Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações 2ª edição*. P. A. Zagatto, E. Bertoletti. São Carlos, RIMA: 486 p.
- Nagel, R. (2002). "DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology." *ALTEX* **19 Suppl 1**: 38-48.

- Nascimento, E. (2008). Cap. 3 - Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações 2ª edição. P. A. Zagatto, E. Bertoletti. São Carlos, RIMA: 486 p.
- Nath, R., R. Kambadur, S. Gulati, V. K. Paliwal and M. Sharma (1988). "Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins." Crit Rev Food Sci Nutr **27**(1): 41-85.
- Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. Fundamentals of Aquatic Toxicology. G. M. Rand. New York, Hemisphere: 416-454.
- Nelson-Smith, A. (1971). The Problem of Oil Pollution of the Sea. Advances in Marine Biology. S. R. Frederick and Y. Maurice, Academic Press. **Volume 8**: 215-306.
- Nikinmaa, M. (2014). Chapter 5 - The Most Important Experimental Designs and Organisms in Aquatic Toxicology. An Introduction to Aquatic Toxicology. M. Nikinmaa. Oxford, Academic Press: 53-63.
- Nikinmaa, M. (2014). Chapter 7 - Chemical Uptake by Organisms. An Introduction to Aquatic Toxicology. M. Nikinmaa. Oxford, Academic Press: 73-80.
- Nikinmaa, M. (2014). Chapter 15 - Interactions Between Natural Environmental Factors and Toxicity. An Introduction to Aquatic Toxicology. M. Nikinmaa. Oxford, Academic Press: 173-184.
- Nikinmaa, M. (2014). Chapter 18 - Modeling Toxicity. An Introduction to Aquatic Toxicology. M. Nikinmaa. Oxford, Academic Press: 173-184.
- Niyogi, S. and C. M. Wood (2004). "Kinetic analyses of waterborne Ca and Cd transport and their interactions in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch (*Perca flavescens*), two species differing greatly in acute waterborne Cd sensitivity." J Comp Physiol B **174**(3): 243-253.
- Nordberg, G. F. and K. Nishiyama (1972). "Whole-body and hair retention of cadmium in mice including an autoradiographic study on organ distribution." Arch Environ Health **24**(3): 209-214.
- Nordberg, G. F., M. Piscator and M. Nordberg (1971). "On the distribution of cadmium in blood." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **30**(3): 289-295.
- Nordberg, M. (1978). "Studies on metallothionein and cadmium." Environ Res **15**(3): 381-404.
- Nordberg, M. and G. F. Nordberg (1975). "Distribution of metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in mice: preliminary studies." Environ Health Perspect **12**: 103-108.
- Nordberg, M. and G. F. Nordberg (2000). "Toxicological aspects of metallothionein." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **46**(2): 451-463.
- Nordberg, M. and G. F. Nordberg (2009). Metallothioneins: historical development and overview. Metallothioneins and related chelators. A. Sigel, H. Sigel and R. K. Sigel, Royal Society of Chemistry. **5**.
- Nornberg, B. F., C. R. Batista, D. V. Almeida, G. S. Trindade and L. F. Marins (2015). "ABC1 and ABC4 efflux transporters are involved in methyl parathion detoxification in ZFL cells." Toxicol In Vitro **29**(1): 204-210.
- Nusslein-Volhard, C. (1994). "Of flies and fishes." Science **266**(5185): 572-574.
- Nüsslein-Volhard, C. a. D., R. (2002). "Zebrafish: a practical approach." New York: Oxford University Press: 303p.
- Nys, C., J. Asselman, J. D. Hochmuth, C. R. Janssen, R. Blust, E. Smolders and K. A. De Schamphelaere (2015). "Mixture toxicity of nickel and zinc to *Daphnia magna* is non-interactive at low effect sizes, but becomes synergistic at high effect sizes." Environ Toxicol Chem.
- O'Flaherty, E. J. (2003). Absorption, Distribution, and Elimination of Toxic Agents. Principles of Toxicology, John Wiley & Sons, Inc.: 35-55.
- OECD (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Publishing.
- Olsson, P. E., M. Zafarullah, R. Foster, T. Hamor and L. Gedamu (1990). "Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*." Eur J Biochem **193**(1): 229-235.

- Pallade, S., M. London, A. Roventa and C. Popovici (1960). "The toxicity of fertilizer widely used in agriculture: superphosphate." Med Lav **51**: 49-58.
- Pane, E. F., J. G. Richards and C. M. Wood (2003). "Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism." Aquat Toxicol **63**(1): 65-82.
- Pascoe, D., S. A. Evans and J. Woodworth (1986). "Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness." Arch Environ Contam Toxicol **15**(5): 481-487.
- Pasqualetti, S., G. Banfi and M. Mariotti (2013). "The effects of strontium on skeletal development in zebrafish embryo." J Trace Elem Med Biol **27**(4): 375-379.
- Pelster, B. and B. Bagatto (2010). 7 - Respiration. Fish Physiology. M. E. A. P. F. Steve F. Perry and J. B. Colin, Academic Press. **Volume 29**: 289-309.
- Penkowa, M., M. Giralt, J. Camats and J. Hidalgo (2002). "Metallothionein 1+2 protect the CNS during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide." J Comp Neurol **444**(2): 174-189.
- Petrucio, M. M. (1998). Caracterização das lagoas Imboassica, Cabiúnas, Comprida e Carapebus. Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). F. d. A. Esteves. RJ, NUPEM/UFRJ: 109-122.
- Poulos, T. L., and E.F. Johnson (2005). Structures of cytochrome P450 enzymes. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. P. R. O. De Montellano, Springer Science & Business Media.
- Rand, G. M., Wells, P. G. and Mccarty, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. 2nd. G. M. Rand. Washington, DC, Taylor & Francis: 3-67.
- Rendic, S. (2002). "Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data." Drug Metab Rev **34**(1-2): 83-448.
- Rendic, S. and F. J. Di Carlo (1997). "Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors." Drug Metab Rev **29**(1-2): 413-580.
- Roe, F. (1993). "Influence of animal species, strain, age, hormonal, and nutritional status." Experimental Toxicology, The Basic Issues, 2nd Edition, Anderson D and Conning D (Editors)(Cambridge: The Royal Society of Chemistry): 23-34.
- Rowe, R. I. and C. D. Eckhert (1999). "Boron is required for zebrafish embryogenesis." J Exp Biol **202 (Pt 12)**: 1649-1654.
- Ryker, S. J. and M. J. Small (2008). "Combining occurrence and toxicity information to identify priorities for drinking-water mixture research." Risk Anal **28**(3): 653-666.
- Schlautman, M. A., S. Yim, E. R. Carraway, J. H. Lee and B. E. Herbert (2004). "Testing a surface tension-based model to predict the salting out of polycyclic aromatic hydrocarbons in model environmental solutions." Water Res **38**(14-15): 3331-3339.
- Schulte, C. N., R. (1994). "Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Branchydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: Preliminary results." ATLA **22**: 12-19.
- Selderslaghs, I. W., A. R. Van Rompay, W. De Coen and H. E. Witters (2009). "Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo." Reprod Toxicol **28**(3): 308-320.
- Serluca, F. C., I. A. Drummond and M. C. Fishman (2002). "Endothelial signaling in kidney morphogenesis: a role for hemodynamic forces." Curr Biol **12**(6): 492-497.
- Shek, A. C. and K. M. Chan (2015). "Effects of Salinity on Metal Uptake and Metallothionein mRNA Levels in the Organs of Tilapia Exposed to Cadmium, Copper, and Zinc Ions." Arch Environ Contam Toxicol.
- Shukla, P., M. Gopalani, D. S. Ramteke and S. R. Wate (2007). "Influence of salinity on PAH Uptake from water soluble fraction of crude oil in Tilapia mossambica." Bull Environ Contam Toxicol **79**(6): 601-605.

- Soffiati, A. (2007). "1.1 Os canais de navegação do século XIX no Norte Fluminense." Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego **1**(2): 13-24.
- Sorg, O. (2014). "AhR signalling and dioxin toxicity." Toxicology Letters **230**(2): 225-233.
- Soukhanov, A. H., K. Ellis and M. Severynse (1992). The American heritage dictionary of the English language, Houghton Mifflin.
- Stegeman, J. J., J. V. Goldstone and M. E. Hahn (2010). 10 - Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology. Fish Physiology. M. E. A. P. F. Steve F. Perry and J. B. Colin, Academic Press. **Volume 29**: 367-439.
- Strecker, R., T. B. Seiler, H. Hollert and T. Braunbeck (2011). "Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **153**(3): 318-327.
- Strilic, B., T. Kucera and E. Lammert (2010). "Formation of cardiovascular tubes in invertebrates and vertebrates." Cell Mol Life Sci **67**(19): 3209-3218.
- Swanson, H. I. and C. A. Bradfield (1993). "The AH-receptor: genetics, structure and function." Pharmacogenetics **3**(5): 213-230.
- Takahashi, Y., Y. Ogra and K. T. Suzuki (2005). "Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner." J Cell Physiol **202**(2): 563-569.
- Tang, R., A. Dodd, D. Lai, W. C. McNabb and D. R. Love (2007). "Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **39**(5): 384-390.
- Teaf, C. M. (2003). Properties and Effects of Organic Solvents. Principles of Toxicology, John Wiley & Sons, Inc.: 367-408.
- Timme-Laragy, A. R., C. J. Cockman, C. W. Matson and R. T. Di Giulio (2007). "Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish." Aquat Toxicol **85**(4): 241-250.
- U.S.EPA. (2009). "National Recommended Water Quality Criteria." Retrieved 09/03/2015, from <http://www.epa.gov/ost/criteria/wqctable/>.
- USEPA (1986). "US Environmental Protection Agency. Guidelines for health risk assessment of chemical mixtures." US Environmental Protection Agency Federal Register **51**(185):**34014–34025**.
- Vieira, S. (2011). Bioestatística tópicos avançados, Elsevier Brasil.
- Volkering, F. and A. M. Breure (2003). "Aspects of Bioavailability." PAHs: An Ecotoxicological Perspective: 81.
- Wallace, K. N. and M. Pack (2003). "Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish." Developmental Biology **255**(1): 12-29.
- Ward, O. P. and C. S. Young (1990). "Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast." Enzyme Microb Technol **12**(7): 482-493.
- Westerfield, M. (1995). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Institute of Neuroscience. University of Oregon.
- Weston, D. P., J. You and M. J. Lydy (2004). "Distribution and toxicity of sediment-associated pesticides in agriculture-dominated water bodies of California's Central Valley." Environ Sci Technol **38**(10): 2752-2759.
- Whitlock, J. P., Jr. (1990). "Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action." Annu Rev Pharmacol Toxicol **30**: 251-277.
- Witeska, M., P. Sarnowski, K. Ługowska and E. Kowal (2014). "The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of *Leuciscus idus* L." Fish Physiology and Biochemistry **40**(1): 151-163.
- Wolf, C. R., P. N. Berry, J. A. Nash, T. Green and E. A. Lock (1984). "Role of microsomal and cytosolic glutathione S-transferases in the conjugation of hexachloro-1:3-butadiene and its possible relevance to toxicity." J Pharmacol Exp Ther **228**(1): 202-208.

Wu, L., Y. Jiang, L. Zhang, L. Chen and H. Zhang (2014). "Toxicity of urban highway runoff in Shanghai to Zebrafish (*Danio rerio*) embryos and luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis*.Q67)." Environ Sci Pollut Res Int **21**(4): 2663-2676.

Yang, L., N. Y. Ho, R. Alshut, J. Legradi, C. Weiss, M. Reischl, R. Mikut, U. Liebel, F. Müller and U. Strähle (2009). "Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals." Reproductive Toxicology **28**(2): 245-253.