

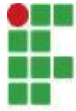
INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA BARBOSA COSTA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PEIXES
EXPOSTOS A MANGANÊS E ZINCO**

LONDRINA

2018



INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

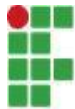
FERNANDA BARBOSA COSTA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PEIXES
EXPOSTOS A MANGANÊS E ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade
Relatório de Pesquisa, apresentado ao curso
Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino
Médio do Instituto Federal do Paraná.

LONDRINA

2018



FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA BARBOSA COSTA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PEIXES EXPOSTOS A MANGANÊS E ZINCO

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade Relatório de Pesquisa, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

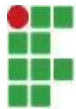
Orientador: _____

Prof(a). Orientador(a)

Prof(a). Componente de Banca 1

Prof(a). Componente de Banca 2

Londrina, ____ de _____ de 2018.



AGRADECIMENTOS

À orientadora, Professora Dra. Luciana Fernandes de Oliveira, por toda a orientação, sugestões e correções, tanto na parte escrita quanto experimental do meu trabalho, apoio e seriedade.

À coorientadora, Professora Dra. Fernanda Martins Oliveira, pelas contribuições prestadas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos, Luanna Dalagrana Gomes, Maria Fernanda Gabriel Santos e Tiago Silva Keneipp, pela amizade e colaboração na realização de experimentos.

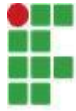
A Caroline dos Santos, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração na realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. Leonardo Carmezini, pela ajuda prestada com manutenção de alguns equipamentos e análises no início do trabalho.

Ao meu namorado, que muitas vezes me incentivou e esteve do meu lado em todo o decorrer do TCC.

A minha mãe, por todo amor e apoio.

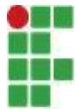
E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.



Ministério da Educação

“A natureza criou o tapete sem fim que recobre a superfície da terra. Dentro da pelagem desse tapete vivem todos os animais, respeitadamente. Nenhum o estraga, nenhum o rói, exceto o homem. ”

(Monteiro Lobato- Miscelânea, 1946)

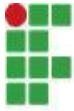


Ministério da Educação

RESUMO

Metais como o manganês e o zinco, essenciais para os organismos vivos em quantidades traço, são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos e por diversas vezes em concentrações altas. Posto isto, parâmetros hematológicos de peixes podem ser utilizados como biomarcadores para auxiliar na compreensão de efeitos de contaminantes na saúde desses animais, pois alterações nesses parâmetros podem indicar a qualidade ambiental do local que os organismos vivem. Assim sendo, testes em laboratório foram feitos a fim de verificar se o Mn e o Zn causam alterações nos parâmetros hematológicos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) e, também, se a mistura desses metais altera os efeitos dos metais isoladamente. Para isso, o experimento consistiu na exposição dos lambaris (n=32), aos dois metais separadamente, na concentração de 1 mg.L^{-1} , e em mistura nas concentrações de 1 mg.L^{-1} de Zn + 1 mg.L^{-1} de Mn, por um período de 96 horas. Ao final do experimento, o sangue dos animais foi coletado e foram realizadas análises de hematócrito, contagem de células vermelhas do sangue (RBC) e quantificação de hemoglobina. Os resultados das análises foram submetidos ao teste de ANOVA considerando diferenças significativas para valores $p < 0,05$. Os resultados mostraram que o Zn causou aumento de RBC e hematócrito, enquanto a exposição ao Mn promoveu apenas o aumento de RBC. Os peixes expostos à mistura de Zn e Mn não exibiram as mesmas alterações que aqueles expostos aos metais separadamente, indicando que eles inibem o efeito um do outro. Esses metais causam, portanto, alterações em parâmetros hematológicos deste peixe, podendo representar um problema na saúde desses animais.

Palavras-chave: Biomonitorios. Metais pesados. Parâmetros hematológicos. Peixes.

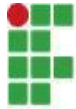


Ministério da Educação

ABSTRACT

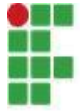
*Metals such as manganese and zinc, essential for living organisms in trace amounts, are often found in aquatic environments and several times in high concentrations. Therefore, hematological parameters of fish can be used as biomarkers to aid in understanding the effects of contaminants on the health of these animals, as changes in these parameters may indicate the environmental quality of the place that organisms live. Thus, laboratory tests were performed to verify that Mn and Zn cause changes in hematological parameters of lambaris (*Astyanax altiparanae*) and also whether the mixture of these metals alters the effects of metals alone. For this, the experiment consisted in exposing the lambaris ($n = 32$) to the two metals separately, in the concentration of 1 mg.L^{-1} , and in a mixture at concentrations of 1 mg.L^{-1} of Zn + 1 mg.L^{-1} of Mn for a period of 96 hours. At the end of the experiment, the animals' blood was collected and hematocrit, red blood cell count (RBC) and hemoglobin quantification were performed. The results of the analyzes were submitted to the ANOVA test, considering significant differences for p values <0.05 . The results showed that Zn caused increase of RBC and hematocrit, while exposure to Mn only promoted the increase of RBC. Fish exposed to the Zn and Mn mixture did not exhibit the same changes as those exposed to the metals separately, indicating that they inhibit the effect of one another. These metals cause, therefore, changes in hematological parameters of this fish, being able to represent a problem in the health of these animals.*

Key-words: *Biomonitoring. Heavy metals. Haematological parameters. Fish.*



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Astyanax altiparanae</i>	19
FIGURA 2 – Disposição de Béqueres do Experimento em Bancada	20
FIGURA 3 – Ilustração da Disposição dos Béqueres	20
FIGURA 4 – Retirada de Sangue de Peixe	21
FIGURA 5 – Quadrante da contagem de Eritrócitos	22
FIGURA 6 – Cartão de Leitura de Hematócrito	22
FIGURA 7 – Hemoglobina (A), número de eritrócitos (B) e hematócrito (C)	25



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C – Controle

Hb – Hemoglobina

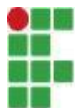
Hct – Hematócrito

M – Mistura

Mn – Manganês

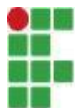
RBC- Eritrócitos

Zn – Zinco



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2 DESENVOLVIMENTO	13
3 METODOLOGIA	19
3.1 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
3.2 ANÁLISE DOS DADOS	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	29



1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, impactos ambientais, mais especificamente, impactos antrópicos, se tornaram mais recorrentes. Notadamente, ambientes aquáticos são os mais afetados pelos efeitos antrópicos, por serem impactados diretamente. Esse fato é devido ao reflexo de atividades que acontecem no entorno desses ambientes, que acaba tornando-os expostos aguda e cronicamente a alguns contaminantes, os quais, são poluentes e acabam prejudicando o desenvolvimento da biota local, levando a uma possível perturbação metabólica nos animais (PAUKA, 2007).

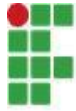
Dentre as classes de contaminantes mais comuns estão os metais, tais como Zinco e Manganês, que muitas vezes são encontrados no ambiente em altas concentrações e em mistura. Em área de mineração de carvão localizada na região central do Paraná, por exemplo, foram detectadas essas condições em campo (OLIVEIRA et al., 2006).

O monitoramento dos impactos pode ser feito através de variáveis biológicas, como exemplo, por parâmetros hematológicos, visto que é pelo sangue que ocorre o transporte de substâncias e elementos necessários à vida, e quando influenciado por contaminação, o quadro hematológico pode ser alterado. Neste parâmetro, destaca-se análises de hematócrito, número de eritrócitos e de hemoglobina, que são utilizados como biomarcadores.

Biomarcadores constituem uma abordagem eficiente para avaliar o risco de impactos ambientais, pois por meio deles é possível detectar de forma precoce os efeitos que podem ocorrer a seres vivos, quando em situações de exposição a ambientes poluídos (FREIRE, 2008).

Os poluentes, mais especificamente os metais, podem acabar alterando parâmetros hematológicos, indicando a toxicidade deles para espécies aquáticas, como no caso de estudo, nos peixes.

Desta forma, com os frequentes impactos ambientais, os biomarcadores se tornam necessários para medidas de monitoramento, fazendo com que, num futuro, tais impactos se tornem menos recorrentes, tanto no ambiente, quanto na saúde de animais.

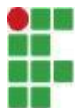


1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das exposições isolada e concomitante de Zn e Mn em parâmetros hematológicos de *Astyanax altiparanae* após 96 horas de teste.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos em *Astyanax altiparanae* expostos isoladamente a Mn 1 mg.L⁻¹ e a Zn 1 mg.L⁻¹.
- Avaliar o efeito da mistura de Zn 1 mg.L⁻¹ e Mn 1 mg.L⁻¹ sobre os parâmetros hematológicos de *A. altiparanae*.
- Comparar os efeitos das exposições isolada e sinérgica de *A. altiparanae* a Zn e Mn.



2 DESENVOLVIMENTO

O homem, ao longo dos anos, promoveu o crescimento progressivo da população de modo desordenado. Hoje, já se ultrapassa os sete bilhões de pessoas e a tendência é que esse número aumente cada vez mais. (ONU, 2017)

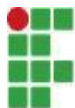
Esse crescimento, que segundo a ONU (2017) eclodiu a partir da década de 1950, é de grande preocupação, pois as principais consequências impactam diretamente os subsistemas da Terra (atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera), que tem como exemplo, escassez de recursos naturais, como também, com o aumento das indústrias e veículos, que contribuem para a poluição ambiental. Essa poluição leva a alterações nas características do ambiente ou em algum de seus componentes, o que acaba prejudicando os diversos ecossistemas.

Um dos principais recursos afetados pela atividade humana é a água. A água é a substância mais abundante na atmosfera, porém apenas uma pequena parte está disponível para utilização humana, sendo 97% de toda a água, está na forma de água salgada, 2,5 % está congelada e 0,5% é água doce líquida disponível. Deste somente 1,2% se apresentam na forma de rios e lagos e 98,8% águas subterrâneas, das quais metade é inviável para utilização humana devido à profundidade (> 800 m) (ANA; CEBDS, 2009).

Estes dados alertam para a necessidade de se evitar e/ou prevenir a contaminação desse recurso. Para Pereira (2001), a contaminação se dá principalmente pelo lançamento de esgotos domésticos, lançamento de esgotos industriais, lançamento de águas pluviais, através de galerias, água de escoamento superficial, água de infiltração e lançamento direto de resíduos sólidos e outras impurezas.

Esses meios de contaminação, quando se tornam presentes no ambiente aquático, influenciam fortemente na vida dos organismos, fazendo com que medidas de monitoramento sejam necessárias. Os organismos, por vezes, podem ser utilizados como biomonitores de condições ambientais.

Segundo Ramos (2005), organismos biomonitores são espécies utilizadas para detecção qualitativa e quantitativa da situação da contaminação ambiental, onde são feitas análises com esses organismos em seu habitat de forma contínua e



padronizada. Eles são quantificados em função da sua origem e durante um certo espaço de tempo.

A utilização de organismos como biomonitores vem desde antigamente. Segundo Buikema e Voshell (1993, citado por MAGALHÃES E FERRÃO FILHO, 2008), um dos primeiros testes de toxicidade com organismos aquáticos que se tem notícia, foi realizado em 1816 com insetos aquáticos.

A qualidade de ambientes aquáticos, um fator fundamental de monitoramento, pode ser avaliada por diferentes variáveis, como biológicas, as quais, medem a qualidade do ambiente baseando-se em respostas dos organismos em relação ao meio que está inserido. De acordo com Souza (2012), o biomonitoramento de um ecossistema lacustre ou marinho pode ser realizado sobre diversos grupos de organismos, tais como peixes, macroinvertebrados, algas, bactérias, entre outros.

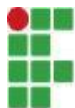
Peixes vêm sendo considerados modelos interessantes para estudos. Isso se deve, a capacidade de ampla dispersão, longa vida útil e também, por ser utilizado para consumo humano. Além disso, com a sua grande capacidade de locomoção, possibilita a pesquisadores, o diagnóstico de uma contaminação de um grande espaço em relação ao ponto de coleta, e por algumas espécies não apresentarem um padrão linear de natação, pode haver um melhor diagnóstico, em toda a coluna d'água (SUKEKAVA, 2014).

Organismos biomonitores são receptores de todos os descartes de resíduos que chegam no ambiente aquático, tornando-os expostos a muitos compostos que podem estar dissolvidos ou depositados em meio ao ecossistema. Sendo assim, estes organismos/animais podem fornecer avisos dos efeitos nocivos da poluição.

Os efeitos nocivos podem se refletir sobre os organismos de uma forma direta e relativamente rápida, ou de uma forma indireta, geralmente ao longo de um período de tempo (CARAPETO, 1999).

Os organismos podem sofrer de bioacumulação, em que compostos químicos, metais pesados ou substâncias são absorvidas pelos mesmos, acumulando-se. Isto pode ocorrer da forma direta, que é quando a substância é adquirida a partir do meio ambiente (solo, sedimento, água) ou da forma indireta pela ingestão de alimentos que contenham essas substâncias.

Esses compostos químicos, metais pesados ou substâncias podem gerar muitos efeitos, sendo motivo de muitos estudos em relação aos perigos para a saúde



animal e humana.

A contaminação do ambiente aquático por metais pesados merece uma maior atenção e por isso, os mesmos vêm sendo estudados há muito tempo, como exemplo, desde a década de 50, devido ao acidente da Baía de Minamata, no Japão, onde pessoas sofreram consequências graves após a ingestão de peixes e mariscos com altas concentrações de metilmercúrio (DIAS, 2004 citado por CASTRO, 2006).

Os metais pesados, em sua maioria, apresentam alta toxicidade e potencial de acumulação, podendo ficar armazenados em águas, solos, e em seres vivos, como os peixes, e com a genotoxicidade de muitos destes metais, podem acabar acarretando em efeitos adversos. Além do mais, eles são substâncias não-biodegradáveis, e são considerados metais pesados por serem elementos com massa atômica maior que a do ferro ($55,8 \text{ g.mol}^{-1}$) ou densidade superior a $5,0 \text{ g/cm}^3$ (PIERZYNSKI et al., 2000, citado por RODRIGUES, 2007).

Segundo Perez (2007 citado por GERALDO, 2011), a principal fonte natural de metais é através do intemperismo dos minerais. Entretanto, eles também podem ser adicionados ao ambiente, advindos de fontes antropogênicas, como, efluentes industriais e domésticos, emissões veiculares, escoamento de lixiviados de aterro, uso de fertilizantes e pesticidas, mineração, entre outros.

Alguns metais como o cobre, ferro, manganês e zinco são considerados essenciais aos organismos, ou seja, apresentam funções biológicas, Estes metais tornam-se tóxicos para a saúde quando ultrapassam concentrações limites, o que pode acabar causando intoxicações crônicas e agudas. A toxicidade manifesta-se por todo o organismo, o que afeta desde vários órgãos, como alteram processos bioquímicos, organelas e até membranas celulares (CARNEIRO et al, 2001 e MIGLIAVACCA, 2009 citado por GERALDO, 2011).

Dentre os metais citados, manganês e zinco estão sendo foco de novas pesquisas, pois são considerados muito relevantes, visto que, além de serem essenciais para os organismos, podem vir a serem tóxicos também. Essas pesquisas se dão, principalmente, em toxicologia aquática, a qual, estuda os efeitos de produtos químicos e outros materiais de atividades antropogênicas sobre organismos aquáticos.

O manganês, um metal cinza escuro, é o 12º elemento mais abundante na crosta terrestre. É muito disseminado no ambiente, estando amplamente distribuído



nos solos, sedimentos e água, e pode ser encontrado em alimentos, sendo as principais fontes, cereais integrais, legumes, verduras e frutas. Além do mais, possui significativas aplicações industriais, sendo a principal, na fabricação de ligas metálicas, particularmente aços, como o ferromangânês (ROCHA, AFONSO, 2012).

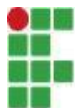
O metal, é essencial para as funções vitais do organismo humano e tem papel importante em organismos animais e vegetais, sendo o elemento, o 3º metal de transição, depois de ferro e zinco, mais importante na nossa alimentação.

Entretanto, o manganês, quando absorvido em excesso pelo organismo humano pode ocasionar efeitos deletérios, ou mesmo efeitos nocivos, que afetam principalmente o trato respiratório e o cérebro. Quando em deficiência, pode causar diversos sintomas, sendo alguns, problemas de pele, desordens esqueléticas e sintomas neurológicos. Já para animais, em quantidades insuficientes, verifica-se, um crescimento anormal, com má formação óssea e problemas de reprodução (CASTRO, 2006).

Segundo a ficha de informação toxicológica do cetesb (2012), o manganês e seus compostos, existem na forma de partículas suspensas na atmosfera devido a erosão do solo, como também de emissões industriais e vulcânicas e da queima de gasolina. Quando presente na água, ele encontra-se na forma dissolvida, sendo um exemplo a água subterrânea anaeróbia que contém elevados níveis de manganês dissolvido, e na forma suspensa, observa-se os rios, onde o manganês é transportado adsorvido a partículas suspensas dos sedimentos. Com isso, o metal, pode acabar acumulando-se em alguns organismos, como moluscos e alguns peixes, fazendo com que haja uma bioacumulação do manganês maior em níveis tróficos inferiores do que em superiores (CETESB, 2012).

Já o zinco, pode ser extraído de diversos minerais. Possui uma coloração branco-azulado e é considerado o 25º elemento mais abundante na crosta terrestre, podendo ser encontrado no ar, água potável, solo, e naturalmente nos alimentos (GERALDO, 2011).

Além disso, pode-se encontrá-lo também com inúmeros usos, como na indústria de medicamentos, de cosméticos, nas indústrias de produção de baterias, fertilizantes, entre outros. Porém, apesar das diversas utilidades, ele pode ser uma fonte de contaminação ambiental, vindo desde fontes naturais, pelas transformações geoquímicas, como fontes antropogênicas, pelas metalúrgicas. Ainda, pode



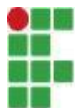
apresentar formas/efeitos tóxicos, relacionando-se pela combinação com outros metais pesados e com a contaminação durante processos de extração e concentração do zinco (RAMOS, 2005).

Esse metal, como o manganês, é considerado essencial para os organismos. Segundo Geraldo (2011), a maior parte deste elemento que entra no organismo é devido a absorção dos alimentos, mas apesar de ser de vital importância, com uma média diária de 10 a 200 mg para os seres humanos, pode levar à uma intoxicação. Se houver excesso do mesmo, surgem sintomas como vômitos, diarreia, fraqueza, dores generalizadas e tosse. Já, segundo Castro (2006), a insuficiência desse metal no organismo, pode causar perda de apetite, do paladar, do olfato, dificuldade na cicatrização de ferimentos e problemas de pele.

O Zn, considerado essencial também para organismos aquáticos, é necessário por ser grupo ativo de diversas enzimas, mas, em concentrações elevadas pode causar danos nas brânquias, como o espessamento do epitélio lamelar, influenciando na captação de oxigênio (NIKINMAA, 2014). Por conseguinte, esse metal, pode aumentar a acidez das águas e se acumular em peixes, o que leva ao fator de bioacumulação e se magnificar na teia alimentar. Também, pode contaminar solos sendo ameaça para plantas e animais, como minhocas, até microrganismos (CASTRO, 2006).

Os organismos aquáticos presentes no ambiente estão constantemente expostos, não só isoladamente, mas na maioria das vezes em forma de misturas, a contaminantes, como no caso, os metais, que por vezes podem ultrapassar valores limites de concentração.

As concentrações limites são estabelecidas pela legislação brasileira, representada pela Resolução CONAMA 357/2005, mas, conforme Oliveira (2017, pág. 18), a resolução “estabelece limites da concentração de compostos isoladamente em efluentes e água, sem que se conheçam de fato os efeitos que a interação deles pode causar aos organismos. ” Deste modo, a Resolução CONAMA nº357 (2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e providências ao abastecimento para consumo humano. Os padrões para água doce classe I (destinada à abastecimento para consumo humano, à proteção de comunidades aquáticas, à recreação de contato primário e à irrigação), prevê concentrações máximas para manganês ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e zinco ($0,18 \text{ mg.L}^{-1}$)



(DOU, 2005).

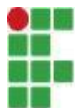
Contudo, atualmente, ainda são poucas as pesquisas que avaliam a toxicidade da contaminação por misturas no meio ambiente. Uma mistura de compostos é sempre formada por duas substâncias ou mais. A mistura pode acabar sofrendo interações entre si, associadas a diferentes processos, podendo ocorrer de uma forma que, com a presença de um composto, a disponibilidade de outro pode diminuir ou até aumentar. Essas diferentes interações promovem variados efeitos em organismos expostos, podendo ser aditivos, agonistas ou antagonistas (NIKINMAA, 2014, SPURGEON et al., 2010, citado por OLIVEIRA, 2017).

A verificação desses efeitos na vida dos organismos pode ser feita através de parâmetros hematológicos (FRIES et al, 2016). Em avaliação de parâmetros hematológicos, podem ser analisados três índices hematológicos, sendo o conteúdo de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Hct) e o número de eritrócitos (RBC). A hemoglobina é uma proteína presente nas hemácias, responsável por transportar o oxigênio pelo corpo. As hemácias também chamadas de eritrócitos ou glóbulos vermelhos, são células encarregadas de transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos e dióxido de carbono no sentido inverso. Já hematócrito, é a porcentagem de volume ocupada pelos glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue.

Comumente, quando organismos são expostos a certos contaminantes, independente do período, podem haver mudanças nos índices hematológicos.

Alterações em parâmetros hematológicos de peixes podem refletir as mudanças no habitat desses animais. Assim, esses parâmetros podem ser indicadores eficientes da saúde dos mesmos, pois constituem um dos primeiros reflexos de algum estresse promovido por alterações ambientais (SIMONATO, 2010). Alterações nesses parâmetros podem ocorrer como consequência da resposta neuroendócrina ou como um efeito direto do poluente nas células sanguíneas (SIMONATO, 2010). Por assim sendo, exemplificando uma situação de exposição a contaminantes, a hemoglobina pode ter sua concentração reduzida juntamente com o eritrócito, indicando uma possível anemia.

Posto tudo isso, medidas de biomonitoramento são essenciais, para evitar ao máximo, problemas ambientais como também, problema na saúde de organismos.



3 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Ciências Biológicas do IFPR Campus Londrina. O trabalho foi aprovado pelo CEUA/IFPR 003/2018 e por isso, o trabalho seguiu com o que foi aprovado pelo comitê.

A metodologia utilizada na execução deste trabalho foi a de avaliação de parâmetros hematológicos, os quais envolvem análises de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (RBC) e hematócrito (Htc).

3.1 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A espécie utilizada neste estudo foi *Astyanax altiparanae*, conhecidos popularmente como lambari do rabo amarelo (n = 32) (FIGURA 1), os quais foram adquiridos em uma estação de piscicultura na cidade de Londrina/PR.

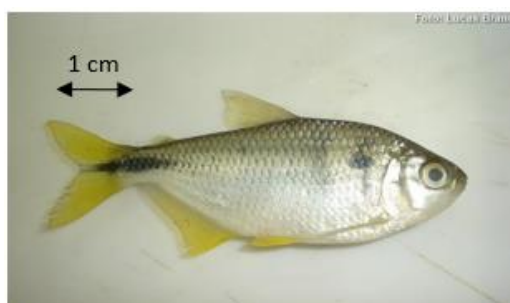


FIGURA 1 – *Astyanax altiparanae*.

O experimento constituiu-se na organização de 32 béqueres de vidro aerados contendo 1,5 L de água desclorificada, divididos em 4 grupos com oito espécimes cada, sendo: grupo 1 denominado “C” de controle, grupo 2 denominado “M” por conter uma mistura de manganês e zinco à concentração de 1 mg.L⁻¹ de cada, grupo 3 de “Zn” e grupo 4 de “Mn”, compostos de zinco e de manganês a concentrações de 1 mg.L⁻¹, respectivamente, como mostrado nas figuras 2 e 3. É válido salientar que a concentração utilizada de 1 mg.L⁻¹ foi devido ao fato que é superior ao estabelecido pela resolução CONAMA, podendo causar algum problema à saúde de um animal.

Os animais foram expostos individualmente em cada béquer.

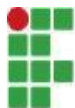


FIGURA 2 – Disposição de béqueres do experimento em bancada.
Fonte: da autora.

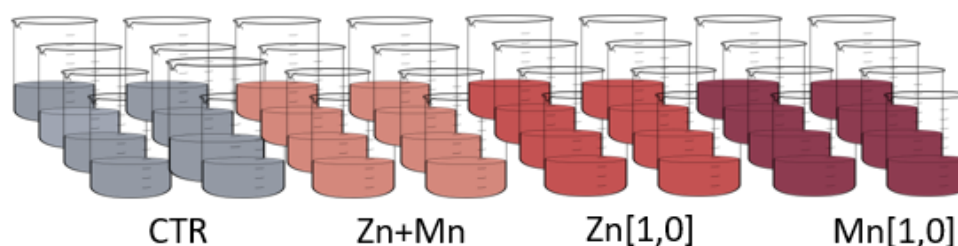


FIGURA 3 – Ilustração da disposição dos béqueres.
Fonte: da autora.

Nessa disposição, os peixes permaneceram expostos por um período de 96 horas (esse tempo foi devido ao fato da revisão de literatura, em que se pode observar que nesse período respostas significativas seriam claramente observadas, o que poderia ser diferente, caso o tempo estipulado da exposição fosse menor que 96 horas), e quando passado esse tempo, iniciou-se a coleta de sangue dos mesmos.

Primeiramente, foi necessário a preparação de uma solução anestésica. Para isso, foi utilizado um recipiente com a solução, sendo 0,3 g de benzocaína dissolvida em 30 mL de álcool para 3 L de água. Após o preparo os peixes eram coletados em ordem numérica de 1 a 32 e colocados nessa solução.

Quando observado que já estavam anestesiados, através do comportamento desses animais, que ficavam “deitados”, eram removidos do meio e o sangue era retirado por meio de punção na veia caudal utilizando seringas heparinizadas, como apresentado na figura 4.

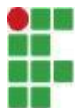


FIGURA 4 – Retirada de sangue de peixe.
Fonte: da autora.

As alíquotas de sangue eram dispensadas em eppendorfes de 1,5 mL e imediatamente procedeu-se as análises.

Para examinar o conteúdo de Hb utilizou-se um método colorimétrico com o cianeto de metahemoglobina utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). Foram preparadas soluções contendo 1,25 mL de reagente de hemoglobina com 5 μ L de sangue total de cada amostra. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e expresso em g dL^{-1} .

Para a quantificação do número de eritrócitos, foi preparada uma solução salina, onde foram adicionadas 995 μ L dessa solução com alíquotas de sangue total de 5 μ L em tubos de ensaio. A leitura foi realizada em câmara de Neubauer contendo lamínulas para cada amostra, sob microscópio óptico, padronizando o sentido da contagem nos 4 quadrantes laterais, conforme a seguir (FIGURA 5), e os dados foram expressos em número de eritrócitos por milímetro cúbico de sangue ($\text{n}^\circ \text{ céls mm}^{-3}$).

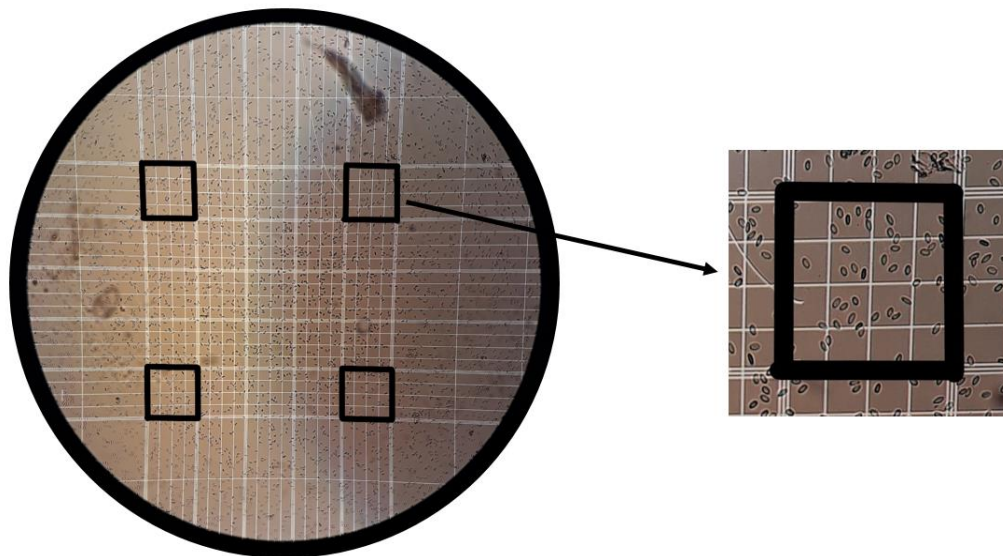
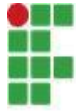
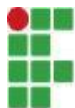


FIGURA 5 – Quadrantes da contagem de eritrócitos.
Fonte: da autora.

Para quantificação do Htc, foram adicionadas alíquotas de sangue total em microcapilares de vidro, os quais, quando preenchidos foram vedados em uma das extremidades com a utilização do bico de Bunsen para evitar perda da amostra e do capilar. Em seguida, foram centrifugados (1200 g, 7 min) em centrífuga para microcapilares. Com o término, a leitura foi realizada em cartão padronizado, através da porcentagem de células vermelhas na amostra, encaixando os limites superior e inferior nas linhas do cartão, como representado pela figura 6, e anotando a proporção que as células ocupavam.



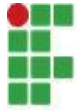
FIGURA 6 – Cartão de Leitura de Hematócrito.
Fonte: BERTELLA; TAGLIARI; TYBURSKI, 2013.



3.2 ANÁLISE DOS DADOS

Para as análises, foram calculados a média, o desvio padrão e o erro padrão dos 4 grupos de amostras, com a utilização de um editor de planilhas, o Microsoft Office Excel. Após, com um software chamado SigmaPlot, utilizado para gráficos científicos e análises de dados, realizou-se a análise estatística dos dados obtidos.

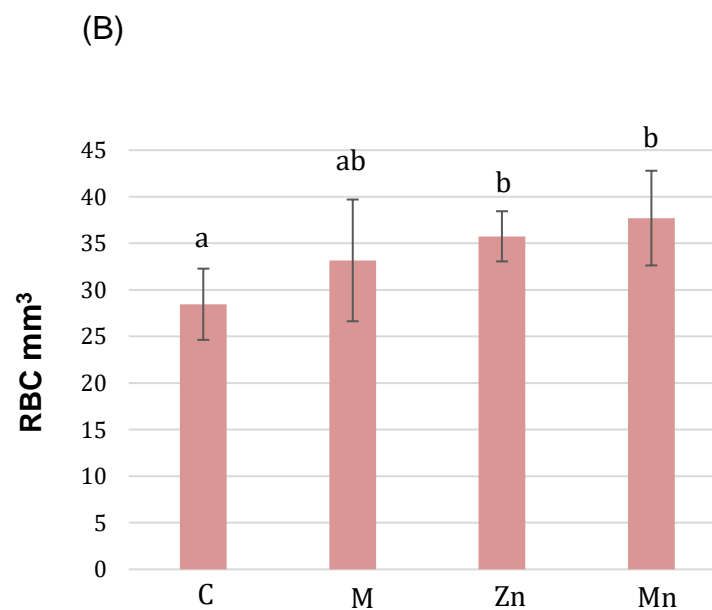
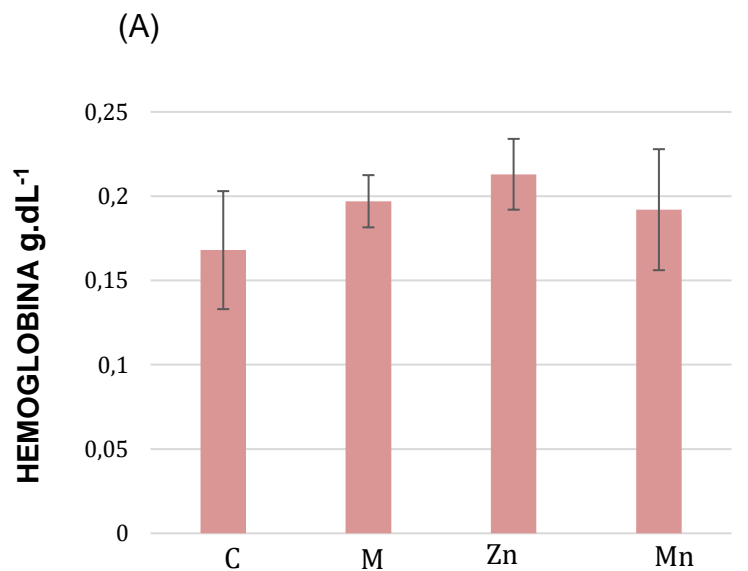
Os resultados obtidos para os diferentes grupos experimentais (C x M x Zn 1,0 x Mn 1,0), com tempo de exposição de 96h, foram primeiro testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância. Após, foram comparados através de análise de variância paramétrica (ANOVA One way). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos espécimes de *Astyanax altiparanae* expostos a mistura, Zn e Mn após 96 h de experimento estão expostos na figura 7, apresentando valores de hemoglobina, eritrócito e hematócrito.

A exposição dos peixes a Mn durante 96 h promoveu aumento somente de RBC (FIGURA 7.B) enquanto a Zn promoveu um aumento no RBC (FIGURA 7.B) e Hct (FIGURA 7.C), em relação aos respectivos C.



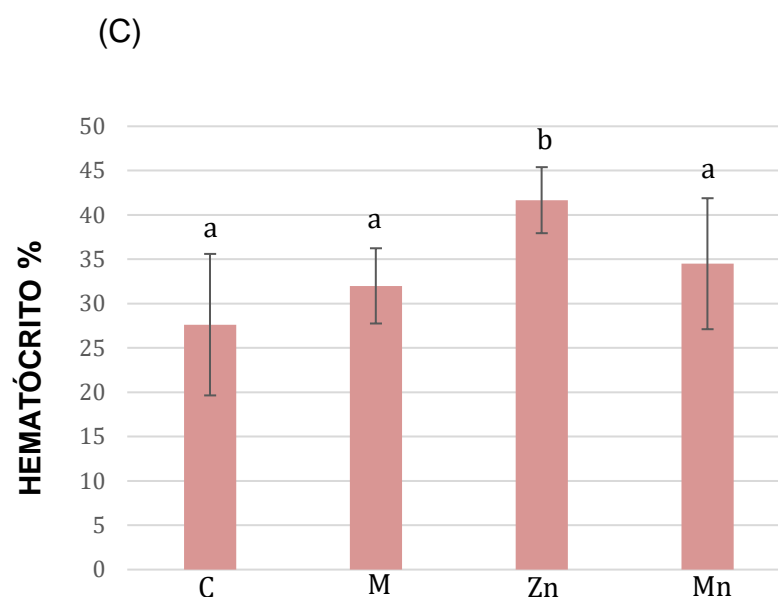
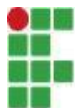
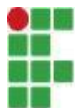


FIGURA 7 – Hemoglobina (A), número de eritrócitos (B) e hematócrito (C) de *Astyanax altiparanae* expostos por 96 h à M (mistura), Zn (zinco), Mn (manganês) ou apenas à água C (controle). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. As barras indicam a média e as linhas verticais o desvio-padrão.

Na literatura, resultados semelhantes aos observados sobre os metais isoladamente, são encontrados, como no trabalho de Witeska e Kosciuk (2003), por exemplo, no qual a exposição de carpas comuns por 3 h a zinco na concentração de 20 mg.L⁻¹ causou um aumento de Hct e RBC. Em contrapartida, o estudo de Wepener, Van Vuren, Du Preez (1992) mostra que o manganês pode causar uma diminuição de RBC e Hb após a exposição de *Tilapia sparrmanii* na concentração de 4,43 mg.L⁻¹ por 96 horas. É importante salientar, portanto, que os efeitos nos parâmetros hematológicos podem ser dependentes das concentrações testadas, tempos de exposição e espécies modelo.

O número de eritrócitos no sangue pode determinar o Hct, uma vez que ele pode chegar a representar 45% do volume sanguíneo (RANZANI-PAIVA, 2013). Além disso, outra possível causa do aumento de Hct pode ser explicado pelo inchaço dos eritrócitos (HEATH, 1995 citado por SALVESTRIN, 2015). No caso da exposição ao zinco, o aumento de Hct ocorreu possivelmente devido ao aumento de RBC, ou seja, eritrócitos novos foram produzidos a fim de elevar a eficiência de captação de oxigênio.

Recentemente, Chen *et al.* (2017) demonstram a importância do zinco na sinalização e estímulo de produção de células do sangue, que pode ocorrer devido a

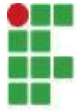


uma condição de hipóxia. Esta, por sua vez, pode estar relacionada às alterações branquiais e diminuição da captação de oxigênio. O aumento de RBC e Hct seriam, portanto, uma compensação necessária para a captação e transporte de gases suficientes.

As brânquias possuem características que fazem com que partículas sólidas não entrem em contato com os filamentos e lamelas, o que poderia ocasionar injúrias. Mas, se agentes irritantes estiverem dissolvidos na água, como no caso, os metais pesados, entrarão em contato com os filamentos branquiais e com as lamelas respiratórias, o que acaba alterando a morfologia da brânquia (RANKIN et al., 1982; LUVIZOTTO, 1994 citado por RIBEIRO, 2007). Mazon *et al.* (2002), mostraram que após exposição aguda de *Prochilodus scrofa* à cobre nas concentrações de 20, 25 e 29 $\mu\text{g.L}^{-1}$ houveram alterações branquiais, como a proliferação de células pavimentosas e hipertrofia, causando o espessamento dos filamentos. O espessamento por sua vez evita a redução da difusão de cobre do meio externo para o plasma sanguíneo, porém, por consequência, dificulta também a captação de oxigênio. Assim, inevitavelmente, ocasionaram alterações dos parâmetros hematológicos.

Alterações branquiais foram percebidas também na pesquisa de Santos *et al.* (2012), que com a exposição aguda de *Astyanax aff. bimaculatus* à concentrações de zinco, sendo 0; 3; 5; 10; 15; e 20 mg.L^{-1} por 96 horas, o metal apresentou alta toxicidade a partir de 5 mg.L^{-1} e causou a morte do peixe nas concentrações de 10, 15 e 20 mg.L^{-1} . As alterações observadas com estas condições foram hiperplasia, fusão lamelar e destruição do epitélio lamelar. Desta maneira, as análises histológicas do tecido branquial poderiam ser complementares com as análises hematológicas, auxiliando a elucidar quais as vias de toxicidade de metais.

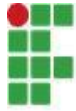
Quando observado o grupo M (mistura), percebeu-se que não ocorreram os mesmos efeitos observados nos peixes expostos aos metais isoladamente, sendo que os valores de RBC e Hct mantiveram-se iguais ao grupo controle. A exposição desses metais em mistura já foi testada por Oliveira (2017) em peixes *Prochilodus lineatus* e bivalves *Anodontites trapesialis* mostrando que, assim como visto no presente trabalho, houve, de modo geral, a redução dos efeitos observados em relação à exposição aos metais isoladamente. Oliveira (2017) ainda comenta que o entendimento de como ocorre a interação entre metais em mistura a partir do uso de



Ministério da Educação

biomarcadores é um desafio complicado, devendo ser consideradas as particularidades químicas de cada metal, além das concentrações e proporções testadas entre os componentes.

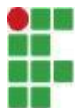
Assim sendo, pode-se observar de um modo geral que os metais, manganês e zinco, influenciaram nos parâmetros hematológicos de *Astyanax altiparanae*, ocasionando, portanto, alguma alteração na saúde dos mesmos.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

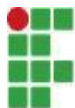
Parâmetros sanguíneos de peixes são biomarcadores clássicos, que se mostraram eficientes na avaliação da toxicidade de diferentes poluentes, isoladamente ou em combinação, dando um diagnóstico do estado funcional dos animais expostos (VENTURA, CORSINI, GABRIEL, 2015). No entanto, neste trabalho, algumas alterações ocorridas nos biomarcadores necessitam de parâmetros complementares para que possam ser melhores explicadas e assim, elucidar as vias de toxicidades dos metais.

Os resultados desta pesquisa reforçam a importância da utilização de biomarcadores para a avaliação e monitoramento de locais impactados por resíduos de atividades antropogênicas, visto que os metais zinco e manganês em concentrações altas podem promover alterações nos organismos expostos, nos alertando antes de um comprometimento de ecossistemas inteiros.



REFERÊNCIAS

- ANA; CEBDS. **Fatos e tendências: água**. 2009. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/fatosetendencias/edicao_2.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2018.
- BERTELLA, T., TAGLIARI, M., TYBURSKI, E. C. **Determinação do micro hematócrito, esfregaço sanguíneo e tipagem sanguínea**. 2013. Disponível em: <<https://www.ebah.com.br/content/ABAAAgNDsAC/tipagem-sanguinea>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- CARAPETO, C. **Poluição das águas: causas e efeitos**. Portugal: Lisboa, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Cristina_Carapeto/publication/259998197_Poluicao_das_Aguas_causas_e_efeitos/links/0a85e52efa6cc6eb71000000/Poluicao-das-Aguas-causas-e-efeitos.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2018.
- CASTRO, S. V. de. **Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto rio das Velhas-MG**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- CETESB. **Manganês: ficha de informação toxicológica**. 2012. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Mangan%C3%AAs.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2018.
- CHEN, Y-H., *et al.* Zinc as a Signal to Stimulate Red Blood Cell Formation in Fish. **Int. J. Mol. Sci.**. China, 2017.
- DOU. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- FREIRE, M. M. *et al.* Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, 12 (3): 347-354, 2008. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2882834.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2018.
- FRIES, E. M. *et al.* Avaliação dos parâmetros hematológicos do pacu *Piaractus mesopotamicus* infectado por *lernea spp.* 2016. **Revista Cultivando o Saber**: volume 9 – nº 4, 479-485 p., 2016. Disponível em: <https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/58542cc4048dc.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2018.
- GERALDO, S. M. **Anéis de crescimento de árvores *Tipuana tipu* como biomonitores da poluição ambiental: quantificação pela técnica de**



fluorescência de raios x por reflexão total com radiação sincrotron.2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MAGALHÃES, D. P.; FERRAO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis: Revistas UFRJ**, Rio de Janeiro, p.355-381, 2008. Disponível em: <<https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/5732/4318>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

MAZON, A. F., *et al.* Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Braz. J. Biol.** São Paulo, 62(4A): 621-631, 2002.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press. Elsevier: 2014, 252p.

OLIVEIRA, L. F. de. **Mistura de metais essenciais (Zn, Mn, Fe) em concentrações ambientalmente relevantes: bioacumulação e efeitos em bivalve e teleosteo neotropicais.**2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

OLIVEIRA, L. F. de *et al.* Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining áreas. **Science of The Total Environment**. Londrina, v.571, p. 983-991, nov. 2016.

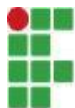
ONU. **World Population Prospects: The 2017 Revision**. 2017. Working Paper No. ESA/P/WP/248. Disponível em:<https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2018.

PAUKA, L. M. **Avaliação dos efeitos embriotóxicos e da biotransformação da fração solúvel do petróleo em água em peixe zebra (Danio rerio – Hamilton, 1822).** 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PEREIRA, G. A natureza (dos) nos fatos urbanos: produção do espaço e degradação ambiental. **Desenvolvimento e Meio ambiente**, n. 3, p. 33-51, 2001. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/made/article/download/3027/2418>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

RAMOS, M. G. M. **Determinação dos teores de metais pesados em plantas típicas dos mangues do Rio Cubatão, SP.**2005.41f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Católica de Santos, Santos, 2005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes.**



Maringá: EDUEM, 2013, 140 p.

RIBEIRO, A. M. **Alterações hematológicas e osmorregulatórias em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo**. 2007.38p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2007.

ROCHA, R. A. da., AFONSO, J. C. Manganês. **Química Nova na Escola**, Vol. 34, Nº 2, p. 103-105, 2012. Disponível em: <
http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_2/11-EQ-23-11.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2018.

RODRIGUES, M. L. K. **Origem, distribuição e mobilidade potencial de metais pesados em ambiente fluvial impactado por curtumes**.2007. Tese (Doutorado em Geociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SALVESTRIN, N. T. **Efeitos do zinco no teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* e na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (zf-I)**.2015. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

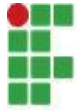
SANTOS, D. C. dos, *et al.* Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Exp. Toxicol. Pathol.**. Minas Gerais: 64 (7-8): 861-6, 2012. Disponível em: <
<https://pdfs.semanticscholar.org/9650/39b666706adc51a4e74d37fff506f315d824.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2018.

SIMONATO, J. D. **Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus***. 2010. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2010.

SOUZA, M. R. de. **Influências ambientais e biológicas sobre organismos zooplantônicos e sua utilização como bioindicadores**.2012.42f. Monografia (Licenciatura em Ciências Naturais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SUKEKAVA, C. F. **Utilização de peixes como biomonitores no estuário da lagoa dos patos**.2014. Monografia (Graduação de Oceanologia) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

VENTURA, A. S., CORSINI, F. E., GABRIEL, A. M. de A. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. **Revista Eletrônica: Nutritime**. Mato Grosso do Sul, vol. 12, nº 06, 2015. Disponível em: <
http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/354_-_4500-4507_-_NRE_12-6_nov-dez_2015.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2018.



Ministério da Educação

WEPENER, V., VAN VUREN, J. H. J., DU PREEZ, H. H. Effect of Manganese and Iron at a Neutral and Acidic pH on the Hematology of the Banded Tilapia (*Tilapia sparrmanii*). **Environ. Contam. Toxicol.**. New York, 49: 613-619, 1992. Disponível em: <
https://www.academia.edu/30673877/Effect_of_manganese_and_iron_at_a_neutral_and_acidic_pH_on_the_hematology_of_the_banded_tilapia_Tilapia_sparrmanii_>. Acesso em: 06 nov. 2018.

WITESKA, M., KOSCIUK, B. The Changes in Common Carp Blood after Short-term Zinc Exposure. **ESPR - Environ Sci & Pollut Res.**. Poland, 10 (5) 284-286 (2003). Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/9057570_Changes_in_common_carp_blood_after_short-term_zinc_exposure>. Acesso em: 06 nov. 2018.