



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCELO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

**BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA EM PEIXES DE RIACHOS DA
AMAZÔNIA ORIENTAL**

Belém – PA

2021

SILDIANE MARTINS CANTANHÊDE

**BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA EM PEIXES DE RIACHOS DA
AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de doutora.

Área de concentração: Biodiversidade

Linha de pesquisa: Conservação e impacto socioambiental sobre ecossistemas aquáticos

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Lund Amado

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Fogaça De Assis Montag

Belém – PA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M379b Martins Cantanhêde, Sildiane.
Biomarcadores de poluição aquática em peixes de riacho da
Amazônia Oriental / Sildiane Martins Cantanhêde. — 2021.
90 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Lílian Lund Amado
Coorientador(a): Prof. Dr. Luciano Fogaça de Assis Montag
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de
Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia, Programa de Pós-
Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2021.
1. Alumínio. 2. Respostas antioxidantes. 3.
Lipoperoxidação. 4. Parâmetros cardíacos. I. Título.

CDD 571

SILDIANE MARTINS CANTANHÊDE

**BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA EM PEIXES DE RIACHOS DA
AMAZÔNIA ORIENTAL**

BANCA EXAMINADORA

26 / 02 / 2021



Profa. Dra. Lillian Lund Amado

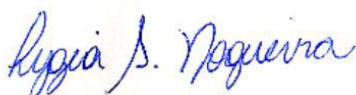
Orientadora

(Universidade Federal do Pará – ICB)



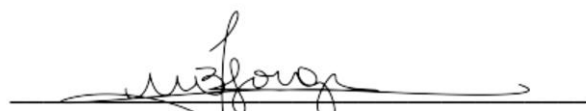
Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha

(Universidade Federal do Pará – Membro interno)



Dra. Lygia Segal Nogueira

(Instituto Evandro Chagas – Membro externo)



Profa. Dra. Marianna Basso Jorge

(Universidade Federal do Maranhão – Membro externo)



Prof. Dr. Luis André Luz Barbas

(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Membro externo)

Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta
(Universidade Estadual do Maranhão – Suplente externo)

Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready
(Universidade Federal do Pará – Suplente interno)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde;

À minha família que é a minha base e o motivo para a concretização desse sonho;

À minha orientadora Profa. Dra. Lílian Amado pela motivação, paciência e por sempre me mostrar uma solução;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luciano Montag pelas grandes contribuições e oportunidade;

Ao Prof. Dr. Moisés Hamoy pela cooperação, oportunidade e confiança;

Aos meus amigos do grupo de pesquisa BioPaq do Laboratório de Ecotoxicologia por toda ajuda nas coletas e análises bioquímicas, pelos momentos de descontração e pela amizade, em especial à Irina, Clayciane e Tayná;

Ao Prof. Dr. Leandro de Carvalho da UFSM e ao Prof. Dr. José Augusto Corrêa da UFPA pelas contribuições nas análises químicas;

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca pela formação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado;

À Hydro pelo suporte financeiro através do Consórcio de Pesquisa em Biodiversidade Brasil-Noruega (BRC);

Obrigada a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho!

RESUMO

A região da Amazônia brasileira ocupa o terceiro lugar na produção mineral de bauxita, minério rico em Alumínio (Al). O Al é um agente pró-oxidante, capaz de induzir estresse oxidativo e causar alterações cardiovasculares nos organismos. Nesse contexto, o objetivo geral desta tese foi avaliar os efeitos do Al sobre respostas de estresse oxidativo os parâmetros cardíacos na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus*. A tese está estruturada em três capítulos: Capítulo I) um estudo de campo, no qual avaliou-se a influência da atividade de mineração de bauxita sobre as respostas bioquímicas na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*, relacionando com os níveis de metais nos tecidos, água e sedimento; Capítulo II) um estudo experimental, onde descreveu-se técnicas de registros eletromiográfico e eletrocardiográfico de respostas normais, durante indução à toxicidade e a recuperação a curto prazo na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*. Esta técnica foi desenvolvida para ser aplicada no capítulo três; Capítulo III) um estudo experimental, no qual avaliou-se os efeitos agudos de diferentes concentrações de Al na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus* por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e respostas cardíacas. No estudo de campo, os peixes e amostras de água e sedimento foram coletados em riachos de uma área de mineração de bauxita na Amazônia Oriental, para as análises de metais (Alumínio, Bário, Cromo, Manganês, Níquel e Chumbo) e análises bioquímicas. Para os estudos experimentais, os peixes foram coletados em riachos longe de interferências antrópicas, localizados na bacia do rio Taiassuí (PA), e aclimatados em laboratório para a realização dos experimentos. A substância utilizada no capítulo dois foi o anestésico Eugenol ($20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) e no capítulo três foi o Sulfato de Alumínio ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Os biomarcadores de estresse oxidativo medidos nos capítulos um e três foram a capacidade antioxidante total (ACAP), a atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST) e a lipoperoxidação (LPO). Os parâmetros cardíacos analisados nos capítulos de experimento (II e III) foram a frequência cardíaca, duração do complexo QRS e dos intervalos PQ, RR e QT. No estudo de campo (capítulo I), as concentrações dos metais, quando quantificados na água e sedimento, estavam abaixo dos valores permitidos pela legislação local, exceto o Alumínio dissolvido na água, encontrado em altas concentrações em todos os pontos. Todos os metais apresentam mudanças na sazonalidade nos compartimentos ambientais, com maiores concentrações no período pós-chuva. Houve bioacumulação de Al nos peixes, a concentração nas brânquias e músculo foi maior nos peixes do entorno da mineração e no fígado foi maior nos peixes do ponto a jusante da mineração. Ba, Cr e Pb foram encontrados apenas nas brânquias dos peixes. Mesmo com acúmulo de metais, os peixes do entorno não

apresentaram estresse oxidativo. ACAP nas brânquias, fígado e músculo foi menor nos peixes da área de mineração em relação aos peixes do entorno. A atividade da GST nas brânquias foi menor nos peixes da área da mineração. No fígado e no músculo dos peixes, a atividade da GST não teve diferença entre os pontos. LPO nas brânquias e fígado foi maior nos peixes da área de mineração, indicando estresse oxidativo. No músculo não teve diferença para LPO entre os pontos. No estudo experimental do capítulo 2, as técnicas de eletromiograma e eletrocardiograma padronizadas mostraram-se eficientes na avaliação de toxicidade a xenobióticos, e as respostas eletrofisiológicas mostraram-se como excelentes biomarcadores evidenciando a suscetibilidade da espécie à substância testada. No capítulo 3, a concentração da maioria dos íons se manteve constante e a concentração de Al total foi maior nos tratamentos de exposição em todos os tempos experimentais. Também foi observado uma maior concentração de Al total no músculo dos animais expostos, indicando a biodisponibilidade no meio experimental. A exposição ao Al não gerou estresse oxidativo nas brânquias, fígado e músculo, mas causou cardiotoxicidade em *B. caudomaculatus*. Os peixes expostos a menor concentração de Al apresentaram prolongamento acentuado do intervalo PQ, interferindo no automatismo das células cardíacas e os peixes expostos a maior concentração de Al apresentaram ausência da onda P, causando bloqueio atrioventricular. Em geral, conclui-se que as alterações bioquímicas encontradas nos peixes dos pontos de dentro da mineração indicam que os animais não foram capazes de evitar o estresse oxidativo causado pela exposição ao Al. Nesses pontos, o Al dissolvido, fração mais importante em termos de toxicidade, apresentou maiores valores nos períodos de amostragem dos peixes. Esses resultados demonstram que a atividade mineradora gera um estresse ambiental no local. O Al foi tóxico nas funções cardíacas de *B. caudomaculatus*. Os resultados gerados nesse estudo poderão subsidiar programas de recuperação e gestão ambiental em áreas de mineração da Amazônia, e fornecem informações valiosas sobre a aplicação de espécies de peixes nativas amazônicas como biomonitores em estudos de avaliação toxicológica de produtos químicos.

Palavras-chave: Alumínio; Respostas antioxidantes; Lipoperoxidação; Parâmetros cardíacos.

ABSTRACT

The Brazilian Amazon region ranks third in the mineral production of bauxite, an ore rich in aluminum (Al). Al is a pro-oxidant agent, capable of inducing oxidative stress and causing cardiovascular changes in organisms. In this context, the general aim of this thesis was to analyze the effects of Al on oxidative stress responses and cardiac parameters in the Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus*. The thesis is divided into three chapters: Chapter I) a field study, which evaluated the influence of bauxite mining activity on biochemical responses in the Amazonian fish species *B. caudomaculatus*, relating them to the levels of metals in tissues, water and sediment; Chapter II) an experimental study, in which electromyographic and electrocardiographic recording techniques of normal responses were described, during induction of toxicity and short-term recovery in the Amazonian fish species *B. caudomaculatus*. This technique was developed to be applied in chapter three; Chapter III) an experimental study, in which the acute effects of different concentrations of Al in the Amazonian fish species *B. caudomaculatus* were evaluated through biomarkers of oxidative stress and cardiac responses. In the field study, fish, water and sediment samples were collected from the streams of a bauxite mining area and surrounding area, in the Eastern Amazon, for the analysis of metals (Aluminum, Barium, Lead, Chrome, Manganese and Nickel) and biochemical analyses. For the experimental studies, the fish were collected from streams away from anthropic interference, located in the Taiassuí River basin (PA), and acclimated in the laboratory for the experiments. The substance used in chapter two was the anesthetic Eugenol ($20 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) and in chapter three was Aluminum Sulfate ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The oxidative stress biomarkers measured in the chapter one and three were the total antioxidant capacity (ACAP), the activity of the enzyme Glutathione-S-transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO). The cardiac parameters analyzed in the experimental study (II e III) were heart rate, duration of the QRS complex and the PQ, RR and QT intervals. In the field study (chapter I), the concentrations of metals, when quantified in water and sediment, were below the values allowed by local legislation, except for dissolved Al in the water, found in high concentrations at all sites. There was a marked seasonality in the concentrations of total and dissolved metals, with the exception of dissolved Al, which remained high in the two sampled periods. All metals show changes in seasonality in the environmental compartments, which high concentrations were in the post-rain period. There was bioaccumulation of Al in fish, the concentration in the gills and muscle was higher in the fish from the surrounding area and in the liver was higher in the point downstream of the mining. Ba, Cr e Pb were found only in the gills of fish. Even with the accumulation of metals,

the fish from the surrounding area did not present oxidative stress. ACAP in gills, liver and muscle was lower in fish from the mining area compared to fish from the surrounding area. GST activity in the gills was lower in fish from the mining area. In the liver and muscle of fish, GST activity had no difference among sites. LPO in gills and liver was higher in fish from the mining area, indicating oxidative stress. There was no difference in muscle for LPO among sites. In the experimental study in chapter 2, the standardized electromyogram and electrocardiogram techniques proved to be efficient in assessing toxicity to xenobiotics, and the electrophysiological responses were excellent biomarkers, evidencing the species susceptibility to the tested substance. In chapter 3, the concentration of most ions remained constant and the concentration of total Al was higher in the exposure treatments throughout the experiment. A higher concentration of total Al was also observed in the muscle of animals exposed to Al, indicating bioavailability in the experimental medium. Exposure to Al did not generate oxidative stress in the gills, liver and muscle. However, it caused cardiotoxicity in *B. caudomaculatus*. Fish exposed to a lower concentration of Al showed marked prolongation of the PQ interval, interfering on the automatism of cardiac cells and fish exposed to a higher concentration of Al showed absence of the P wave, causing atrioventricular blockade. In general, it is concluded that the biochemical changes found in fish from points inside the mining indicate that the animals were not able to avoid oxidative stress caused by exposure to Al. In those points, dissolved Al, the most important fraction in terms of toxicity, showed higher values in the fish sampling periods. These results demonstrated that mining caused environmental stress at the site. Al was toxic to the cardiac functions of *B. caudomaculatus*. The results of this study may support environmental management and recovery programs in mining areas in the Amazon, and provide valuable information on the application of native Amazonian fish species as biomonitors in studies of toxicological assessment of chemicals.

Keywords: Aluminum; Antioxidant responses; Lipoperoxidation; Cardiac parameters.

SUMÁRIO

TEXTO COMPLEMENTAR	11
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 1	18
Ambientes naturalmente ricos em Al e modificados por atividade de mineração induzem estresse oxidativo em peixes residentes?	18
PERGUNTA	18
HIPÓTESE	18
OBJETIVOS	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
ARTIGO CIENTÍFICO	19
CAPITULO 2	43
Electrophysiological responses in Amazonian fish species <i>Bryconops caudomaculatus</i> (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity	43
PERGUNTA	43
HIPÓTESE	43
OBJETIVOS	43
Objetivo geral.....	43
Objetivos específicos.....	43
ARTIGO CIENTÍFICO	44
CAPÍTULO 3	52
Cardiotoxicidade na espécie de peixe amazônica <i>Bryconops caudomaculatus</i> (Osteichthyes: Characiformes) por exposição aguda a diferentes concentrações de Alumínio	52
PERGUNTA	52
HIPÓTESE	52
OBJETIVOS	52
Objetivo geral.....	52
Objetivos específicos.....	52
ARTIGO CIENTÍFICO	53
CONCLUSÕES GERAIS	80
ANEXO 1	81
ANEXO 2	83

TEXTO COMPLEMENTAR

Os contaminantes presentes em um determinado ambiente existem como uma mistura complexa e a sua interação com os organismos torna-se difícil de se entender apenas pela medição desses químicos no meio ou na biota (Beg et al., 2015). Nesse contexto, os organismos biomonitores fornecem informações a respeito dos efeitos dos contaminantes que interagem na complexidade dos sistemas naturais (Friberg et al., 2011). Os peixes são bons biomonitores para avaliar a condição e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Abdel-Moneim; Al-Kahtani; Elmenshawy, 2012) e têm sido amplamente utilizados como organismos sentinelas em estudos de Ecotoxicologia para a avaliação da qualidade ambiental (Brandão et al., 2015; Fasulo et al., 2012), principalmente devido a sua capacidade de metabolizar, acumular e concentrar poluentes ambientais (Cappello et al., 2016).

A necessidade de ferramentas rápidas e sensíveis para revelar os efeitos dos contaminantes em organismos aquáticos levou ao uso de biomarcadores em peixes (Fonseca et al., 2016). Biomarcadores são alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas que são medidas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo e são indicadores de exposição aos xenobióticos e / ou seus efeitos (Lam; Gray, 2003). Os biomarcadores demonstram a existência de exposição, indicando o efeito, e estabelecem a ligação entre o xenobiótico e toxicidade (Ryan et al., 2007). Entre os biomarcadores, destacam-se os biomarcadores bioquímicos, pois são respostas em baixo nível de organização biológica (Van Gestel; Van Brummelen, 1996), são técnicas sensíveis (Sogorb et al., 2014) e rápidas (Gil; Hernández, 2009).

Os biomarcadores de estresse oxidativo, medidos por meio de respostas antioxidantes e danos oxidativos, são biomarcadores bioquímicos bastante utilizados para avaliar o efeito biológico dos xenobióticos (Giarratano; Gil; Malanga, 2014). As defesas primárias contra produtos químicos e estressores físicos são as enzimas antioxidantes, proteínas metalotioneínas, antioxidantes não enzimáticos, como glutatona; e enzimas de biotransformação de fase I e fase II, como o citocromo P450 e a glutatona-S-transferase, respectivamente (Colin et al., 2016). Em nível bioquímico, os contaminantes são capazes de induzir alterações na homeostase redox celular através da indução e/ou produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas são capazes de causar danos oxidativos a componentes celulares importantes como lipídeos, proteínas e DNA (Hermes-Lima, 2004). Assim, as defesas celulares contra essas espécies

tóxicas e as análises de danos oxidativos podem ser utilizadas como biomarcadores (Regoli; Giuliani, 2014; Viarengo et al., 2007).

Um outro método possível de avaliar os efeitos dos poluentes nos peixes é a avaliação dos registros do eletrocardiograma (ECG) desses animais. O ECG fornece um gráfico que representa a atividade elétrica do coração, e também fornece uma voltagem de tempo do batimento cardíaco (Goldberger, 2012). As ondas do ECG (P, Q, R, S e T) e os intervalos de tempo (PR, QRS, ST e QT) (Sheffield et al., 1969) são usadas para detectar e monitorar doenças em peixes (Endo et al., 1988; Kojima et al., 2004). Esses parâmetros foram usados para diferenciar peixes saudáveis e doentes (Yoshikawa et al., 1988; Langheinrich et al., 2003). A frequência cardíaca em peixes teleósteos está na mesma faixa que em humanos, e o ECG é muito semelhante ao de humanos com ondas P, Q, R, S e T identificáveis (Olson; Farrell, 2006; Kermorgant et al., 2015). Além disso, os peixes teleósteos têm canais iônicos transmembranares específicos para controlar a repolarização ventricular bastante semelhantes aos seus ortólogos humanos (Leong et al., 2010). Portanto, o ECG de peixes pode ser uma boa ferramenta para avaliar os efeitos tóxicos dos contaminantes.

Dos contaminantes ambientais, os metais são um dos mais nocivos, pois causam toxicidade nos organismos aquáticos, dependendo da sua concentração, forma química e biodisponibilidade – a fração do metal que pode ser assimilada pelos organismos (Ye et al., 2015). Os metais diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos por não possuírem caráter de biodegradação, de maneira que podem acumular-se nos componentes ambientais onde manifestam sua toxicidade (Voigt et al, 2016). Esses elementos se acumulam nos organismos a partir da exposição direta ao sedimento ou água, ou seja, contato com compartimento contaminado, ou progressivamente pela cadeia trófica, indicando assimilação via alimentação (Zhang et al., 2012).

Um metal relevante em termos de toxicidade é o Alumínio (Al), um metal não-essencial que causa efeitos tóxicos nos organismos (Gensemer; Playle, 1999). A forma iônica do Al (Al^{3+}) não tem papel fisiológico nos processos metabólicos (Exley; House, 2011), mas pode ser um metal tóxico para humanos e animais (Becaria et al., 2002) quando há alta carga corporal do metal após exposição natural ou não natural (Exley, 2013). As altas taxas de carga / tamanho da forma iônica são responsáveis pela capacidade do Al de polarizar fortemente outras moléculas em tecidos biológicos (Exley and Mold, 2015). Sua ligação é principalmente eletrostática, e o Al tem alta afinidade para o oxigênio em grupos fosfato e carboxilato de ligantes doadores, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e

proteínas. Essas propriedades físicas dão ao Al o potencial de produzir efeitos tóxicos nos organismos aquático e na saúde humana (Walton, 2019).

O Al ocorre em águas naturais devido ao intemperismo de rochas e minerais contendo Al e à sua mobilização do ambiente terrestre para o aquático (Campbell et al., 1992). O solo da Amazônia é rico em Al, devido a sua constituição geomorfológica, composto principalmente por Fe e Al (Melo et al., 2018). A composição química da bauxita da Amazônia Oriental é composta por 49,9% do minério puro de Alumina na forma de Gibbsita (Angélica et al., 2018). No entanto, a região da Amazônia tem sofrido impactos por atividades de mineração, em especial a mineração de bauxita para a produção de Alumínio (Al). No processo de extração da bauxita, ocorre a mobilização do Al do ambiente terrestre para o aquático, podendo aumentar a sua concentração no meio e sua biodisponibilidade para a biota. Então, o uso de biomarcadores em peixes residentes de riachos amazônicos possibilitará um melhor entendimento dos efeitos tóxicos do Al onde as concentrações são naturalmente altas.

Diante disso, o objetivo geral desta tese é avaliar os efeitos do Al sobre as respostas de estresse oxidativo e os parâmetros cardíacos na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus*. A tese é composta por três capítulos que são apresentados em forma de artigos científicos juntamente com a pergunta, hipótese e objetivos. O capítulo 1 é um estudo de campo e os capítulos 2 e 3 são estudos experimentais. Em todos os capítulos utiliza-se a espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus* como biomonitor e respostas eletrofisiológicas e/ou bioquímicas como biomarcadores.

O capítulo 1 é intitulado “Ambientes naturalmente ricos em Al e modificados por atividade de mineração induzem estresse oxidativo em peixes residentes?” e será submetido para a revista *Science of the Total Environment*, com Qualis A para Biodiversidade.

O capítulo 2 é intitulado “Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity” e foi publicado na revista *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C*, com Qualis A para Biodiversidade.

O capítulo 3 é intitulado “Cardiotoxicidade na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) por exposição aguda a concentração ambientalmente relevante de Alumínio” e será submetido a revista *Aquatic Toxicology*, com Qualis A para Biodiversidade.

REFERÊNCIAS

Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A., Elmenshawy, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v. 88, p. 1028–1035, 2012.

Angélica, R.S., Kahn, H., Paz, S.P.A. A proposal for bauxite quality control using the combined Rietveld - Le Bail - Internal Standard PXRD method – Part 2: Application to a gibbsite bauxite from the Paragominas region, northern Brazil. **Minerals Engineering**, v. 122, p. 148-155, 2018.

Becaria A., Campbell A., Bondy S. C. Aluminum as a toxicant. **Toxicology and Industrial Health**, v.10, p. 309–320, 2002.

Beg, M. U., Jandal, N., Al-Subiai, N., Karam, Q., Husain, S., Butt, A., Ali, A., Al-Hasan, A., Al-Dufaileej, S., Al-Husaini, M. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwaits' marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, p. 662–672, 2015.

Brandão, F., Cappello, T., Raimundo, J., Santos, M. N., Maisano, M., Mauceri, A., Pacheco, M., Pereira, P. Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress. **Metallomics**, v. 7, p. 1352–1363, 2015.

Campbell P. G. C., Hansen H. J., Dubreuil B., Nelson W. O. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt: Organic acid pulse and aluminum mobilization. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, p. 1938–1952, 1992.

Cappello, T., Brandão, F., Guilherme, S., Santos, M. N., Maisano, M., Mauceri, A., Canário, J., Pacheco, M., Pereira, P et al. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining ¹H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. **Science of the Total Environment**, v. 548-549, p. 13–24, 2016.

Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 307–323, 2016.

Endo, M., Foscarini, R., Kuroki, A. Electrocardiogram of a marine fish, *Pagrus major*, exposed to red tide plankton, *Chattonella marina*. **Marine Biology**, v. 97, p. 477–481, 1988.

Exley C. Human exposure to aluminium. **Environmental Science: Processes & Impacts Impact**, v. 15, p. 1807–1816, 2013.

Exley C., House E. Aluminium in the human brain. **Monatshefte fur Chemie**, v.142, p. 357–363, 2011.

Exley, C., Mold, M. J. The binding, transport and fate of aluminum in biological cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 90e95, 2015.

Fasulo, S., Iacono, F., Cappello, T., Corsaro, C., Maisano, M., D'Agata, A., Giannetto, A., De Domenico, E., Parrino, V., Lo Paro G., Maureci, A. Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 139–146, 2012.

Fonseca, A. R., Sanches Fernandes, L. F., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, S. M., Pacheco, F. A. L. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 972–986, 2016.

Friberg, N., Hildrew, A., Woodward, G., Bonada, N., Bradley, D., Dunbar, M., Hayes, R., Lamouroux, N. Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems. The Good, the Bad and the Ugly. In Guy Woodward, Ed: **Advances in Ecological Research**, Vol. 44, Amsterdam, The Netherlands, 2011, pp. 1-68.

Gensemer R. W., Playle R. C. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 315–450, 1999.

Gensemer, RW, Playle, RC. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. V. 29, p. 315-450, 1999.

Giarratano, E., Gil, M. N., Malanga, G. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 111–119, 2014.

Gil, F., Hernández, A. F. Significance of Biochemical Markers in Applied Toxicology. **General and Applied Toxicology**, p. 847–857, 2009.

Goldberger, A. L. **Clinical electrocardiography: a simplified approach**. Elsevier Health Sciences 347. Springer, India, pp. 17–39, 2012.

Hermes-Lima, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: STOREY, K. B. (Ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. New Jersey: John Wiley & Sons, pp. 319–368, 2004.

Kermorgant, M., Lancien, F., Mimassi, N., Le Mével, J. C. Central actions of serotonin and fluoxetine on the QT interval of the electrocardiogram in trout. **Comparative Biochemistry & Physiology**, Part C: Toxicology and Pharmacology, 167, 190–199, 2015.

Kojima, T., Ishii, M., Kobayashi, M., Shimizu, M. Blood parameters and electrocardiogram in squeezed fish simulating the effect of net damage and recovery. **Fisheries Science**, v. 70, p. 860–866, 2004.

Lam, P. K. S.; Gray, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182–186, 2003.

Langheinrich, U., Vacun, G., Wagner, T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, p. 370–382, 2003.

Leong, I. U., Skinner, J. R., Shelling, A. N., Love, D. R. Zebrafish as a model for long QT syndrome: the evidence and the means of manipulating zebrafish gene expression. **Acta Physiology**, v. 199, p. 257–276, 2010.

Melo, V. F., Batista, A. H., Barbosa, J. Z., Barbeiro, L., Gomes, R., Dultra, M. T. M. Soil quality and reforestation of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa Bonpl.*) after laterite-type bauxite mining in the Brazilian Amazon forest. **Ecological Engineering**, v.125, p. 111-118, 2018.

Olson, K. R., Farrell, A. P. **The Cardiovascular System**. In: Evans, D.H., Clairbone, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*, third ed. Taylor and Francis Group, pp. 119–152, 2006.

Regoli, F., Giuliani, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, 2014.

Ryan, P. B., Burke, T. A., Hubal, E. A. C., Cura, J. J., McKone, T. E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 833–840, 2007.

Sheffield, L. T., Holt, J. H., Lester, F. M., Conroy, D. V., Reeves, T. J. On-line analysis of the exercise electrocardiogram. **Circulation**, v. 40, p. 935–944, 1969.

Sogorb, M. A., Pamies, D., de Lapuente, J., Estevan, C., Estévez, J., Vilanova, E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. **Toxicology letters**, v. 230, p. 356–367, 2014.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C: Toxicology and Pharmacology, v. 146, p. 281–300, 2007.

Voigt, C. L., da Silva, C. P., de Campos, A. X. Avaliação da bioacumulação de metais em *Cyprinus carpio* pela interação com sedimento e água de reservatório. **Química Nova**, v. 39, p. 180-188, 2016.

Walton, J. R. **Bioavailable Aluminum**: Its Metabolism and effects on the environment. Encyclopedia of environmental health. 2nd ed. pp. 328-339, 2019.

Ye, H., Zang, S., Xiao, H., Zhang, L. Speciation and ecological risk of heavy metals and metalloid in the sediments of Zhalong Wetland in China. **International Journal Environment. Science Technology**, v. 12, p. 115-124, 2015.

Yoshikawa, H., Ishida, Y., Yokoyama, Y., Ueno, S., Mitsuda, H. Electrocardiograms in five bipolars leads recorded from the body surface of three fish species (*Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus* and *Pagrus major*) in fresh or sea-water. **Comparative Biochemistry & Physiology**. 91 (4), 759–764, 1988.

Zhang G. S., Liu, D. Y., Wu, H. F., Chen, L. L., Han, Q. X. Heavy metal contamination in the marine organisms in Yantai coast, northern Yellow Sea of China. **Ecotoxicology**, v. 21, p.1726-1733, 2012.

CAPÍTULO 1

Ambientes naturalmente ricos em Al e modificados por atividade de mineração induzem estresse oxidativo em peixes residentes?

Capítulo a ser submetido para a revista Science of the Total Environment (Fator de impacto: 6.551) com Qualis A para Biodiversidade (normas para a escrita do artigo em anexo).

PERGUNTA

A atividade de mineração de bauxita interfere nas respostas antioxidantes induzindo estresse oxidativo em peixes residentes de riachos da Amazônia Oriental?

HIPÓTESE

Em ambientes aquáticos com concentrações naturais de Al, os peixes residentes possuem um sistema de defesa antioxidante basal eficiente, mas peixes de áreas com atividade de mineração de bauxita, têm suas respostas antioxidantes afetadas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a influência da atividade de mineração de bauxita sobre as respostas de estresse oxidativo na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*, relacionando com os níveis de metais em tecidos, água e sedimento.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição crônica ao Al sobre respostas antioxidantes (Capacidade antioxidante total e atividade da Glutathione-S-transferase) da espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Avaliar os efeitos oxidativos da exposição crônica ao Al nos lipídios de membrana por meio da Lipoperoxidação na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Quantificar as concentrações de metais em sedimento, água e tecidos e relacionar os níveis de metal da água e sedimento com os tecidos.

ARTIGO CIENTÍFICO

Ambientes naturalmente ricos em Al e modificados por atividade de mineração induzem estresse oxidativo em peixes residentes?

Sildiane Martins Cantanhêde^{ade}, Irina Sofia Cardoso de Carvalho^{ade}, Gabriel Moraes Reis^b, Gabriela Câmara Leal^b, Franciele Rovasi Adolfo^b, Leandro Machado de Carvalho^b, Luciano Fogaça de Assis Montag^{ac}, Lílian Lund Amado^{ade*}

^aPrograma de Pós-graduação em Ecologia aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.

^bLaboratório de Análises Químicas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^cLaboratório de Ecologia e Conservação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

^dLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

^eLaboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

*Autor para correspondência: Lílian Lund Amado. E-mail: lilian.amado@gmail.com; lla@ufpa.br; Telefone: +55 91 991765500. Laboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110. Belém, Pará, Brasil.

Destaques

- As respostas antioxidantes dos peixes são acionadas de acordo com o gradiente de influência da atividade de mineração.
- Os peixes do ponto localizado no entorno da área de mineração são capazes de evitar o estresse oxidativo.
- Os peixes dos pontos localizados dentro da área de mineração apresentam maior lipoperoxidação nas brânquias e fígado, demonstrando geração de estresse oxidativo.

Resumo

Amazônia Oriental possui naturalmente altas concentrações de Al no solo, por isso possui grandes empreendimentos de mineração. Nesse contexto, avaliamos a influência da atividade de mineração de bauxita sobre as respostas de estresse oxidativo na espécie de peixe *Bryconops caudomaculatus*, relacionando com os níveis de metais em tecidos, água e sedimento. Água e sedimento foram coletados sazonalmente em estações transicionais (períodos pós-chuvas e de pós-estiagem), em um ponto no entorno da mineração (P1) e pontos dentro da área de mineração (P2 – montante e P3 – jusante), para análise dos metais Al, Ba, Cr, Pb, Mn e Ni. Peixes foram coletados no período de pós-estiagem para análise de metais e biomarcadores (Capacidade antioxidante total do organismo - ACAP, atividade da Glutathione-S-transferase - GST e lipoperoxidação - LPO) em brânquias, fígado e músculo. Houve diferenças sazonais dos metais em todos os pontos, sendo as maiores concentrações verificadas no período pós-chuvas. Exceto o Al dissolvido que teve maiores concentrações no período de pós-estiagem e foram acima do valor estabelecido pela legislação nos pontos e ambos os períodos. Foi observado acúmulo de Al nos tecidos em todos os pontos. Nas brânquias e músculo, Al foi maior nos peixes do entorno, que apresentaram aumento da ACAP nos tecidos e da GST nas brânquias e diminuição da LPO nas brânquias e no fígado. Já os peixes de dentro da área de mineração tiveram maior acúmulo de Al no fígado. Esses peixes apresentaram diminuição da ACAP nos tecidos e da GST nas brânquias, e aumento na LPO nas brânquias e no fígado, indicando estresse oxidativo e que *B. caudomaculatus* refletiu o status do estresse ambiental local, do ponto de vista biológico. Concluímos que os animais externos à área de mineração foram capazes de evitar danos oxidativos, devido a eficiente capacidade antioxidante, o que não foi observado nos peixes dos pontos sob maior influência da mineração (P2 e P3), a presença de estresse oxidativo em brânquias e fígado de *B. caudomaculatus* refletiu o status do estresse ambiental local, do ponto de vista biológico.

Palavras-chave: Bauxita; Respostas antioxidantes; Lipoperoxidação; peixe amazônico.

1. Introdução

As minas de bauxita ocorrem em grandes superfícies planas em escala continental, expostas a um clima tropical de monções, em que condições hidráulicas ideais são controladas pelo equilíbrio entre precipitação e evaporação (Herrington et al., 2016; Thorpe; Watve, 2016). O minério de bauxita consiste em uma mistura de minerais de hidróxido de alumínio ou oxihidróxido e impurezas como caulinita, hematita, quartzo, ferro e titânio (Angélica et al., 2018). Os líderes na produção de bauxita incluem Austrália, Brasil, Guiné, China e Índia (Melo et al., 2018). No Brasil, a região da Amazônia Oriental ocupa lugar de destaque na produção mineral de bauxita, sendo o terceiro maior depósito deste minério no mundo (Costa et al., 2014), decorrente da sua constituição geomorfológica com grande concentração de hidróxido de alumínio (Kotschoubey et al., 2005). Devido a este grande potencial, atrai mineradoras para a extração deste recurso. Apesar da mineração trazer benefícios econômicos e sociais (Söderholm and Svahn, 2015), esta atividade causa impactos nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Lottermoser, 2010).

O Al é o elemento metálico mais abundante da Terra (Exley and House, 2011). Na região amazônica, esse metal é encontrado naturalmente em altas concentrações, devido a composição química do solo (Costa et al., 2014). No entanto, o Al em altas concentrações pode causar efeitos tóxicos (Gensemer and Playle, 1999), pois é um metal não essencial e não degradável (Exley and Mold, 2015). Na célula, o Al é um pró-oxidante que induzindo aumento de espécies reativas de oxigênio (Walton, 2019). Organismos residentes de áreas onde as concentrações de Al são naturalmente altas, têm um sistema antioxidante eficiente para se protegerem dos efeitos tóxicos do Al (Oliveira et al., 2017). Em áreas com interferências de atividades de mineração de bauxita, a potencialidade tóxica do Al pode aumentar, pois a extração e o processamento da bauxita aumentam a concentração desse elemento nos compartimentos ambientais (Clarck et al., 2015). Então, organismos residentes de áreas de mineração de bauxita podem ter suas repostas antioxidantes afetadas. Nesse contexto, é necessário o uso de ferramentas que nos forneça informações sobre a exposição e os efeitos biológicos da toxicidade do Al em áreas de mineração.

Os biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo, medidos a partir de enzimas antioxidantes e danos oxidativos, são ferramentas eficazes para avaliar o efeito tóxico do Al (Abdalla et al., 2019). As respostas bioquímicas são normalmente as primeiras alterações biológicas a serem detectadas, apresentam alta especificidade e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (Regoli and Giuliani, 2014). A capacidade antioxidante total do organismo (ACAP, *Total Antioxidant Capacity Against*

Peroxyl Radicals) é um biomarcador que mede a capacidade antioxidante do animal, que inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, de neutralizar os radicais peroxil gerados pela exposição a contaminantes (Amado et al., 2009). Outro biomarcador importante para medir a eficiência do sistema antioxidante dos organismos são as enzimas Glutathione S-transferase (GST). GSTs são um importante mecanismo de detoxificação intracelular para subprodutos oxidados (Papadopoulos et al., 2004), desempenhando também outras funções como regeneração de proteínas S-tioladas e biossíntese de metabólitos fisiologicamente importantes (Armstrong, 1997; Sheehan et al., 2001). A Peroxidação lipídica (LPO) é um biomarcador de efeito que mensura os danos oxidativos causados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio frente a uma exposição a contaminantes, indicando estresse oxidativo no organismo (Almroth et al., 2005). A LPO medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tem sido usada como biomarcador bioquímico em uma série de estudos ambientais (Ramírez-Duarte et al, 2017).

Em estudos de monitoramento de áreas de mineração é importante avaliar as respostas biológicas em espécies residentes, visto que passam todo o ciclo de vida sob os efeitos ambientais locais. Dessa forma, a espécie utilizada nessa pesquisa é a espécie de peixe residente de riachos amazônicos *Bryconops caudomaculatus* (Günther 1864) pertencente à família Iguanodectidae (Characiformes). *B. caudomaculatus* é encontrada em pequenos riachos, lagos e rios costeiros do escudo da Guiana, Orinoco e Bacia Amazônica (Wingert and Malabarba, 2011). Esta espécie é considerada insetívora, e eventualmente frugívora (Silva et al., 2008). Somente dois estudos avaliaram as respostas biológicas causadas por exposição a estressores nessa espécie nativa amazônica, como Cantanhêde et al. (2020) e Ribeiro et al. (2017) que expuseram *in vivo* a espécie a um anestésico e a amônia, respectivamente.

Diante disso, nosso objetivo foi avaliar a influência da atividade de mineração de bauxita sobre as respostas de estresse oxidativo na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*, relacionando com os níveis de metais em tecidos, água e sedimento. A hipótese deste estudo é de que em ambientes com altas concentrações naturais de Al, os peixes residentes possuem um sistema de defesa antioxidante eficiente, mas peixes de áreas com atividade de mineração de bauxita, têm suas respostas antioxidantes afetadas pelo incremento na mobilização e biodisponibilidade deste metal.

2. Material e Métodos

2.1 Área de estudo e desenho amostral

As coletas foram realizadas em uma área de mineração de bauxita, situada no depósito de bauxita de Paragominas (PA), Amazônia Oriental brasileira. A mina de bauxita está em atividade desde 2007 e localiza-se a aproximadamente 70 km do município de Paragominas. Na mineração Paragominas, a bauxita é extraída e passa por etapa de beneficiamento, que consistem em britagem, moagem e classificação. O minério beneficiado é misturado com água, formando uma polpa que é bombeada através de um mineroduto de 244 quilômetros até a cidade de Barcarena (PA), onde a Alumina é extraída da polpa por uma série de processos químicos para a produção do Alumínio. Em Paragominas, a água do beneficiamento é tratada e armazenada em barragens e os rejeitos do beneficiamento de bauxita são armazenados em barragens para secagem e compactação das camadas depositadas (Hydro, 2020).

As coletas foram realizadas em um ponto no entorno da área de mineração (P1), localizado no rio Cachoeirinha (3°18'17,5" S - 47°39'47,2" W) e em dois pontos no rio Potiritá, localizado dentro da área de mineração. Neste, foram selecionados um ponto a montante do rio – P2 (3°13'30.698" S - 47°45'8.399" W) e um a jusante do rio – P3 (3°14'39.372" S - 47°45'20.016" W). A seleção dos pontos de coleta obedece a um gradiente de influência da mineração no ambiente. O ponto P1 sofre menor influência da mineração, sendo localizado acima das lavras de bauxita. Os pontos P2 e P3 sofrem influência direta da mineração, pois estão localizados abaixo das lavras de bauxita e das bacias de armazenamento da água e dos rejeitos do beneficiamento. P2 recebe água tratada após o beneficiamento da bauxita em alguns trechos e P3 contém trechos com sedimento da bauxita nas margens. P1, P2 e P3 apresentam também influência de pastagens (Figura 1).

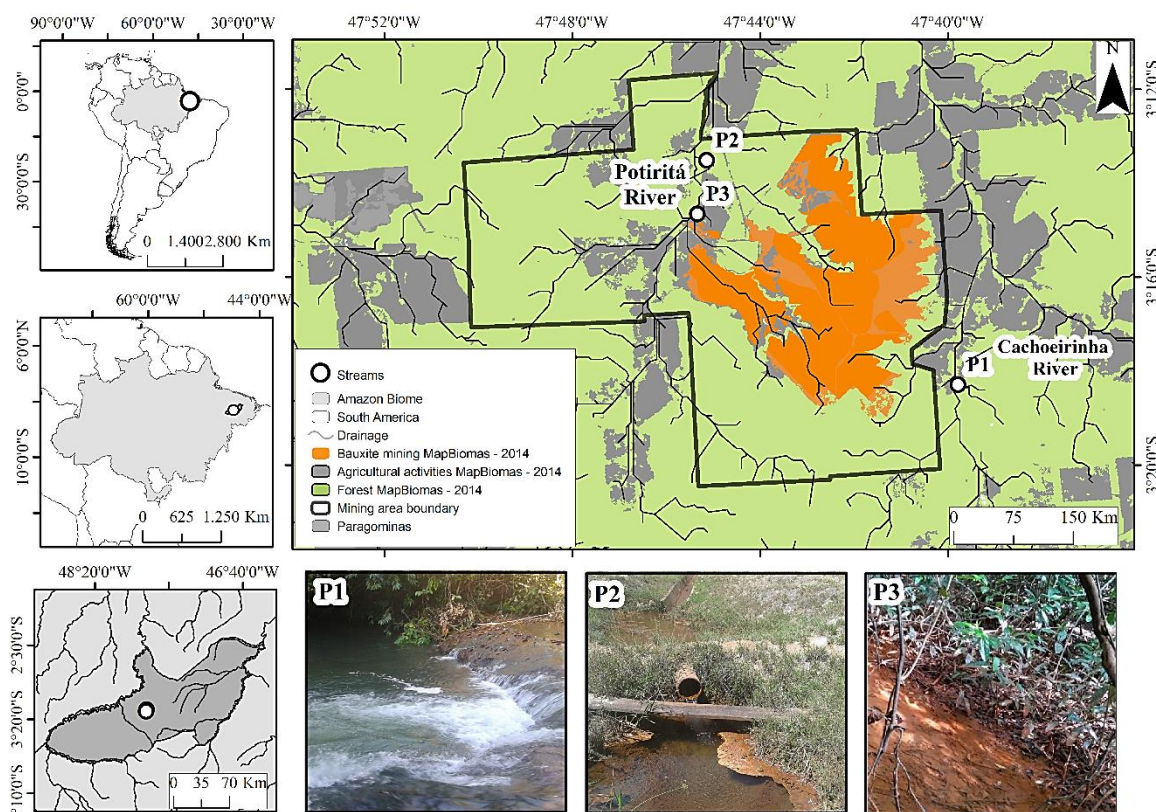


Figura 1. Locais de coleta de peixes, água e sedimento no entorno e dentro da área de mineração de bauxita, Amazônia Oriental. P1: ponto no entorno da área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração.

2.2 Coleta de água, sedimento e peixes

Água (fração total e dissolvida) e sedimento foram coletados em dois períodos hidrológicos transicionais, período pós-chuvas (expedição 1; julho/2018) e período pós-estiagem (expedição 2; novembro/2018) para análises de metais. Dados pluviométricos obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) validam a categorização destes períodos hidrológicos transicionais (Figura 2). As amostras de água e sedimento foram coletadas em triplicata, em três trechos de cada ponto com aproximadamente 200 m de distância entre eles. As amostras de sedimento foram coletadas em sacos plásticos a 1m da margem do riacho. As amostras de água foram coletadas em tubos *Falcon* previamente acidificados e foram acidificadas *in situ* com ácido nítrico (65%). Para a análise de metais dissolvidos na água, as amostras foram filtradas *in situ* com o uso de filtro de membrana 0,45 μm . Todas as amostras foram refrigeradas até as análises dos metais. Durante a coleta, as variáveis físico-químicas da água foram medidas *in situ* para caracterizar o ambiente no momento da coleta, por meio de sonda multiparamétrica da marca HORIBA®: oxigênio dissolvido (mg/L), condutividade ($\mu\text{S/cm}$), pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

A coleta de peixes ocorreu apenas no período pós-estiagem (2ª expedição). Um total de cento e cinquenta exemplares de *B. caudomaculatus* foram coletados em cada ponto usando rede de arrasto com esforço amostral de 5h por dia. Logo após a captura, os peixes foram imediatamente crioanestesiados, eutanasiados e armazenados em nitrogênio líquido até as análises bioquímicas. A coleta dos peixes foi autorizada pelo órgão do governo federal SISBIO – ICMBIO (nº 4681-1) e pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Pará (nº 8293020418 – ID 000954).

No Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Pará (PA) os peixes adultos (n= 100 para cada ponto) foram medidos (7.4 ± 0.9 cm), pesados (0.004 ± 0.0018 kg) e dissecados para a retirada de brânquias, fígado e músculo para as análises de biomarcadores de estresse oxidativo e de concentração de metais. Devido ao tamanho pequeno da espécie, foi realizado *pool* de amostras dos tecidos para se atingir a biomassa necessária para as análises bioquímicas (~250 mg de tecido úmido por amostra). As fêmeas ovadas foram retiradas da amostragem, pois a produção de ovos interfere nas respostas bioquímicas (Ramírez-Duarte et al, 2017).

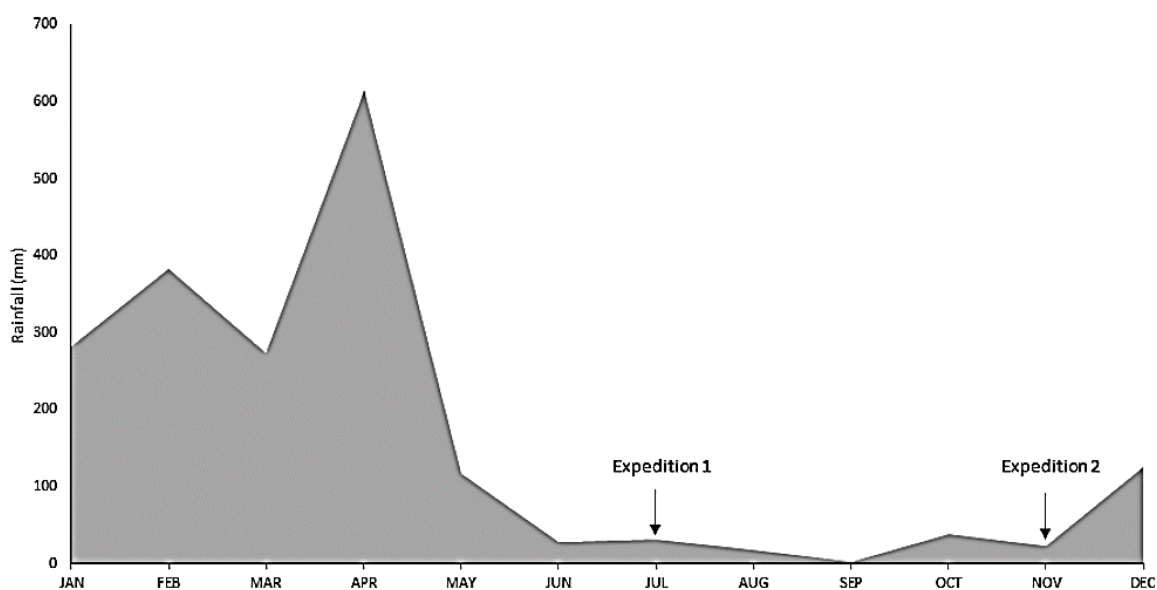


Figura 2. Precipitação acumulada (mm) em 2018. Dados da estação A212 do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em Paragominas.

2.3 Análises de metais em água, sedimento e organismos

Os metais analisados foram o Alumínio (Al), o principal componente da bauxita, além dos metais de interesse toxicológico Bário (Ba), Chumbo (Pb), Cromo (Cr), Manganês (Mn) e Níquel (Ni). Estes metais foram selecionados baseado no estudo realizado pelo Instituto Evandro Chagas (PA), onde quantificaram tais metais em altas concentrações em amostras de águas superficiais do rio Murucupi em Barcarena (PA), nas proximidades da área de beneficiamento da polpa oriunda de Paragominas, após eventos de intensas chuvas na região em 2018 (IEC, 2018). As análises de metais foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Maria (RS), por espectrometria de absorção atômica utilizando técnicas de atomização por chama e forno de grafite (NOVAA 300 e Analytik Jena Zenit 600), de acordo com Welz and Sperlingo (1999).

As amostras dos tecidos foram acidificadas com 10 mL de ácido nítrico P.A. (65%) e aquecidas até a digestão completa. Durante o aquecimento, foi adicionado 3 mL de peróxido de hidrogênio (50%). Após a conclusão da digestão, as amostras foram diluídas em 50 mL de água ultra pura (Mili-Q). As amostras de sedimento foram inicialmente processadas por digestão ácida empregando a mistura oxidante $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, de acordo com o método de referência 3050B (Digestão Ácida de Sedimentos, Lodos e Solos, Revisão 2) descrito pela United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2007). Após a digestão total, as amostras foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q) e analisadas de acordo com as metodologias validadas para cada elemento. As amostras de água foram analisadas diretamente, sem processamento ou diluição.

As concentrações dos elementos foram calculadas em $\mu\text{g/L}$ (ppb) para água e mg/kg (ppm) para sedimento e tecido. As metodologias foram revalidadas utilizando amostras certificadas pelo National Institute of Standards and Technology (NIST) e pelo European Reference Materials (ERM). A determinação da exatidão das metodologias utilizou três diferentes materiais certificados pelo NIST e pelo ERM: (1) Standard Reference Material 1640a para água; (2) Standard Reference Material 1646a para sedimento e (3) Reference Material BCR® – 414 para tecido.

Os resultados obtidos foram comparados com os dados das resoluções locais N° 454/2012 para sedimento e N° 357/2005 para água, ambas do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

2.4 Análises bioquímicas

Os biomarcadores analisados foram a Capacidade antioxidante total (ACAP), a atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST) e a Lipoperoxidação. Para isso, as amostras de tecidos foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão com pH 7.5, segundo o método de Bainy et al. (1996). Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 x g por 20min a 4°C e o sobrenadante removido para as análises. Para a relativização dos resultados de GST e diluição dos tecidos para a análise da ACAP, foi determinado a quantidade de proteínas das amostras por meio do teste de Biureto com kit comercial (Doles LTDA).

Para a análise da ACAP seguiu-se o método de Amado et al. (2009), em que determina a capacidade antioxidante das amostras com e sem exposição a um gerador de radicais, o peróxil 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4nM), usando 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) como substrato. Os radicais peróxil são produzidos por decomposição termal (37° C) do ABAP. Na presença dos radicais peróxil o H₂DCF-DA intercepta os elétrons dos radicais e gera um fluorocromo, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525 nm para excitação e emissão, respectivamente. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão menor formação de radicais peróxil. Os resultados foram expressos como o inverso da área relativa.

A análise da atividade da GST foi de acordo com o método descrito por Habig and Jakoby (1981), em que avalia a conjugação de Glutathione reduzida (GSH, 1µM) com o substrato 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, 1µM), processo catalisado pela enzima GST presente na amostra. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima de 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Como meio de reação é utilizado tampão Fosfato 0,1 M, pH 7,0. Os resultados foram expressos em UGST/mg de proteína, que representa a quantidade necessária da GST para catalisar a conjugação de 1 µMol de CDNB/min/mg de proteína.

A Lipoperoxidação foi determinada pelo método para fluorimetria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Oakes and Kraak (2003). Este método quantifica um subproduto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). No ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a uma temperatura de 95°C, formando o complexo MDA-TBA₂, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553 nm para emissão e excitação, respectivamente. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como antioxidante para as amostras e 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. O Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8.1%) foi utilizado como surfactante e o n-Butanol para separar a fase orgânica da inorgânica. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido.

2.5 Análise estatística

Inicialmente os pressupostos de normalidade e a homogeneidade dos dados foram testados com os testes Shapiro-Wilks e Levene, respectivamente. A análise de variância (ANOVA - *one way*) com teste *post-hoc* de Tukey foram utilizados para verificar diferenças significativas das concentrações dos metais e dos biomarcadores nos tecidos entre os pontos. A análise de variância fatorial (ANOVA - *two way*) com teste *post-hoc* de Tukey foi utilizada para verificar diferenças significativas dos metais na água e sedimento entre os pontos e períodos sazonais. Para os dados não paramétricos, as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Nemenyi. O nível de significância adotado foi de 5% (Zar, 1999).

3. Resultados

3.1 Variáveis físico-químicas da água

Os parâmetros físico-químicos determinados da água não variaram entre os pontos em ambos os períodos (Tabela 1). O pH da água foi ácido em todos os pontos e em ambos os períodos hidrológicos e foi abaixo dos valores estabelecidos pela resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece valores entre 6 e 9. Os valores de oxigênio dissolvido foram de acordo com os valores estabelecidos pela resolução. Para a condutividade e a temperatura não existe um limite máximo destes parâmetros tidos como aceitáveis na legislação local, mas mantiveram-se constantes.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas no entorno e dentro da área de mineração de bauxita, Amazônia Oriental.

Parâmetros	Pós-chuvas			Pós-estiagem			CONAMA 357/2005
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
pH	4.76±1.08*	4.2±0.09*	4.35±0.37*	4,5±1.03*	5.2±1.05*	5,2±0.08*	6,0 a 9,0
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6.73±0.05	6.16±0.05	6.57±0.15	6.45±0.07	6.82±1.02	6.63±0.23	> 6
Condutividade (µS/cm)	32.26±0.47	29.2±2.05	29.17±3.54	27.5±0.32	28.2±1.26	30.1±2.15	----
Temperatura (°C)	25.7±0.566	26.26±1.11	25.82±0.66	26.7±0.82	26.36±0.15	26.6±0.26	----

P1: ponto no entorno da área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração.

*: Valores fora do recomendado pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).

Valores expressos em média ± desvio padrão.

3.2 Concentração de metais no sedimento e na água

Os resultados dos metais nas amostras de sedimento e água estão representados na Tabela 2. Todos os metais quantificados em ambos os períodos hidrológicos, apresentaram diferença na sazonalidade, a concentração foi maior no período pós-chuvas (julho/18) em

relação ao pós-estiagem (novembro/18) em todos os pontos, tanto no sedimento quanto na água ($p < 0,05$). Exceto o Al dissolvido, que apresentou maiores concentrações no período pós-estiagem em relação ao período pós-chuvas. Os metais dosados nas amostras de sedimento e água que possuem um limite máximo de concentração na resolução do CONAMA para ambientes de água doce, apresentaram concentrações abaixo dos valores estabelecidos. A exceção é o Al dissolvido, que apresentou alta concentração e valor acima do estabelecido pela resolução em todos os pontos e em ambos os períodos.

Nas amostras de sedimento do período pós-chuvas, Cr, Ni e Pb apresentaram concentrações superiores no ponto a montante da mineração (P2) em relação a P1 e P3 (Cr: $F = 11.667$, $p = 0.00029$; Ni: $F = 5.9795$, $p = 0.0078$; Pb: $H = 12.5961$, $p = 0.0018$). As concentrações desses metais no ponto do entorno (P1) e no ponto a jusante da mineração (P3) não apresentaram diferença entre si. A concentração de Al foi significativamente maior no P3 e menor no P1 ($H = 7.4391$, $p = 0.0242$). Bário e Mn apresentaram concentrações semelhantes em todos os pontos (Ba: $F = 3.0898$, $p = 0.0639$; Mn: $F = 2.0602$, $p = 0.1494$). Já no período pós-estiagem, as concentrações no sedimento de Cr, Ni e Pb não se diferenciaram entre os pontos (Cr: $F = 17.9589$, $p = 0.0685$; Ni: $F = 4.5199$, $p = 0.0515$; Pb: $F = 2.7014$, $p = 0.0874$). As concentrações de Mn e Al foram maiores no P2 em relação ao P1 (Mn: $F = 4.4353$, $p = 0.0229$; Al: $F = 20.94$, $p = 0.00005$). Bário não foi detectado nas amostras. Em ambos os períodos hidrológicos, as concentrações de Cr, Ni e Pb no sedimento foram abaixo dos valores estabelecidos pela resolução CONAMA 454/2012. Não há um limite máximo para concentração de Al, Ba e Mn no sedimento na resolução. Mas, conforme o esperado, Al total no sedimento foi encontrado em altas concentrações.

Na fração total das amostras de água, o Pb não foi detectado em ambos os períodos hidrológicos. No período pós-chuvas, a concentração total de Al foi maior no P1 em relação ao ponto a jusante P3 ($F = 4,0358$, $p = 0,0308$). A concentração total de Mn foi maior em ambos os pontos de dentro da mineração em relação a P1 ($F = 22.270$, $p < 0.0001$). Bário apresentou concentrações semelhantes em todos os pontos ($H = 3.2426$, $p = 0.1976$). Cr, Ni e Pb não foram detectados nas amostras. Já no período pós-estiagem, a concentração de Al total foi maior no ponto a jusante P3 e menor no ponto a montante P2 ($F = 0.778$, $p < 0.0001$). As concentrações de Mn, Cr e Ni não mostraram diferenças entre os pontos (Mn: $F = 5.2317$, $p = 0.1300$; Cr: $F = 0.1327$, $p = 0.8763$; Ni: $F = 0.0632$, $p = 0.9388$). Bário total não foi detectado nas amostras de água. Em ambos os períodos hidrológicos, as concentrações totais de Ba, Cr e Ni estiveram abaixo dos valores estabelecidos pela resolução do CONAMA 357/2005. Não há limite máximo

para concentração total de Mn e Al na resolução. Mas, de acordo com o esperado, o Al total na água foi encontrado em altas concentrações.

Em relação à fração dissolvida dos metais na água no período de pós-chuvas, Ba manteve concentração constante em todos os pontos ($F=3.1235$, $p=0.0622$) e Cr não foi detectado. Neste mesmo período, a concentração de Al dissolvido foi maior no ponto P1 e menor no ponto P3 ($F= 2.7480$, $p<0.0001$). Esse resultado também foi obtido para a concentração total nesse período. No período pós-estiagem, foi verificado o padrão inverso para Ba e Cr: Ba não foi detectado e Cr não apresentou diferenças entre os pontos ($F=1.9080$, $p=0.1702$). A concentração de Al dissolvido foi maior no ponto P3 e menor no ponto P1 ($F=0.3895$, $p<0.0001$), resultado oposto ao período de pós-chuvas. A concentração de Mn foi maior nos pontos de dentro da mineração (P2 e P3) e menor no ponto do entorno em ambos os períodos hidrológicos (Pós-chuvas: $F= 36.9522$, $p<0.0001$; Pós-estiagem: $F=9.7262$, $p=0.0008$). Ni e Pb não foram detectados em ambos os períodos. Não há um limite máximo para concentração dissolvida de Ba, Cr e Mn na resolução. Já a concentração de Al dissolvido foi acima do valor estabelecido pela resolução ($100 \mu\text{g/L}$) em todos os pontos e em ambos os períodos.

- 1 Tabela 2. Concentração de metais das amostras de sedimento e água coletadas no entorno e dentro da área de mineração de bauxita, Amazônia
 2 Oriental nas duas expedições realizadas

Sedimento (mg/Kg)	Pós-chuvas (julho 2018) – Expedição 1			Pós-estiagem (novembro 2018) – Expedição 2			LQ	CONAMA 454/2012
	P1	P2	P3	P1	P2	P3		
Al	7033.75±3185.92 Aa	7419.61±2518.17 Ab	9981.96±1046.45 Ac	1534.05±389.77 Ba	4636.76±1680.50 Bb	3538.93±900.93 Bc	0.07	----
Ba	2.26±0.97 a	3.09±1.20 a	2.27±0.99 a	<LQ	<LQ	<LQ	0.04	----
Cr	2.44±1.20 a	4.8±0.38 Ab	3.24±0.52 Aa	<LQ	1.84±0.99 Ba	1.35±0.95 Ba	0.04	90
Mn	23.47±9.2 Aa	25.58±9.48 Aa	20.06±5.29 Aa	0.88±0.64 Ba	2.21±1.24 Bb	1.22±0.98 Bc	0.06	----
Ni	0.47±0.20 a	1.02±0.76 Ab	0.56±0.17 Aa	<LQ	0.15±0.02 Ba	0.16±0.07 Ba	0.03	35.9
Pb	3.12±0.83 Aa	4.5±1.36 Ab	3.21±0.90 Aa	0.84±0.70 Ba	1.84±1.01 Ba	1.37±0.99 Ba	0.04	91.3
Água (µg/L) CT	P1	P2	P3	P1	P2	P3	LQ	CONAMA 357/2005
Al	344.47±56.23 Aa	261.84±72.22 Ab	249.68±64.55 Ac	172,86±69.36 Ba	130,35±63.87 Bb	193,24±32.33 Bc	1.06	----
Ba	2.25±1.34 a	1.40±0.43 a	1.46±1.25 a	<LQ	<LQ	<LQ	0.05	700
Cr	<LQ	<LQ	<LQ	2.40±0.50 a	2.56±0.81 a	2.49±0.71 a	0.06	50
Mn	3.88±0.53 Aa	7.19±1.35 Ab	7±1.89 Ab	2.13±0.79 Ba	3.04±1.04 Ba	3.24±0.33 Ba	0.08	----
Ni	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.88±0.43 a	1.01±0.22 a	0.04	25
Pb	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.06	10
Água (µg/L) CD	P1	P2	P3	P1	P2	P3	LQ	CONAMA 357/2005
Al	282.72±54.77* Aa	239.25±91.35* Ab	213.27±72.98* Ac	133.43±29.97* Ba	209.34±51.51* Bb	242.39±192.22* Bc	1.06	100
Ba	1.21±0.65a	1.10±0.54a	1.19±0.59a	<LQ	<LQ	<LQ	0.05	----
Cr	<LQ	<LQ	<LQ	1.71±0.68a	2.39±0.70a	2.27±0.97a	0.06	----
Mn	3.30±0.86 Aa	6.56±1.14 Ab	7.21±1.08 Ab	2.02±0.79 Ba	3.51±1.05 Bb	3.83±0.92 Bb	0.08	----
Ni	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.04	----
Pb	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.06	----

P1: ponto no entorno da área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração.

CT: Concentração total; CD: Concentração dissolvida.

LQ: Limite de quantificação.

*: Valores acima do recomendado pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).

Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística sazonal no mesmo ponto (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os pontos por expedição (p<0.05).

Valores expressos em média ± erro padrão e mediana ± primeiro quartil.

3.5 Concentração de metais e biomarcadores em *Bryconops caudomaculatus*

Os resultados mostraram acúmulo de Al nos tecidos dos peixes de todos os pontos. Nas brânquias de *B. caudomaculatus*, a concentração de Al foi menor no ponto a montante da mineração (P3) e não teve diferença entre o ponto a jusante da mineração (P2) e o ponto do entorno (P1) ($F= 18.6261$, $p=0.0002$) (Fig. 3A). No fígado dos peixes, a concentração de Al foi maior no ponto P3 e não teve diferença entre os pontos P2 e P1 ($F= 5.6671$, $p= 0.0203$) (Fig. 4A). No músculo dos peixes, a concentração de Al foi maior no ponto P1 e não teve diferença entre os pontos P2 e P3 ($F= 7.4151$, $p= 0,008$) (Fig. 5A).

Os metais Pb e Cr não foram detectados em nenhum dos órgãos analisados. A concentração de Ba nas brânquias ($P1= 0.044\pm 0.014$; $P2= 0.041\pm 0.013$; $P3=0.036\pm 0.005$) foi semelhante em todos os pontos ($F= 5.2342$, $p= 0.1307$) e não foi detectado no fígado e no músculo dos peixes. Os metais Ni e Mn foram encontrados apenas nas brânquias dos peixes (Ni: $P1= 0.139 \pm 0.009$, $P2= 0.072 \pm 0.007$, $P3= 0.066 \pm 0.014$; Mn: $P1= 8.785 \pm 0.470$, $P2= 6.595\pm 0.855$; $P3= 1.073\pm 0.093$), com menores concentrações no ponto P3 (Ni: $F= 13.5427$, $p= 0,0008$; Mn: $F= 145.4940$, $p<0.0001$). A concentração desses metais não teve diferença entre os pontos P2 e P1.

Nas brânquias (Fig. 3B), fígado (Fig. 4B) e músculo (Fig. 5B) de *B. caudomaculatus*, a ACAP foi menor nos exemplares dos pontos da área de mineração (P2 e P3) e maior nos peixes do entorno (P1) (Brânquias: $F= 9.8906$, $p= 0.000096$; Fígado: $F= 4.35819$, $p= 0.0174$; Músculo: $F= 12.9580$, $p= 0.00007$). Em relação a atividade da GST, nas brânquias foi menor nos peixes dos pontos da área de mineração e maior nos peixes do entorno ($F= 4.5468$, $p= 0.0123$) (Fig. 3C), mesmo resultado obtido para ACAP. No fígado ($F= 1.290$, $p= 0.2834$) e no músculo ($F= 0.0688$, $p= 0.9335$) dos peixes, a atividade da GST não teve diferença entre os pontos (Fig. 4C and 5C). A Lipoperoxidação (LPO) nas brânquias (Fig. 3D) e fígado (Fig. 4D) dos peixes foi bem alta, sendo maiores nos pontos de dentro da mineração em ambos os tecidos (Brânquias: $F= 6.768$, $p= 0.0016$; Fígado: $F= 1.8959$, $p= 0.0118$), indicando estresse oxidativo. No músculo, a LPO foi muito baixa e não teve diferença entre os pontos ($F= 0.7726$, $p= 0.4637$) (Fig. 5D).

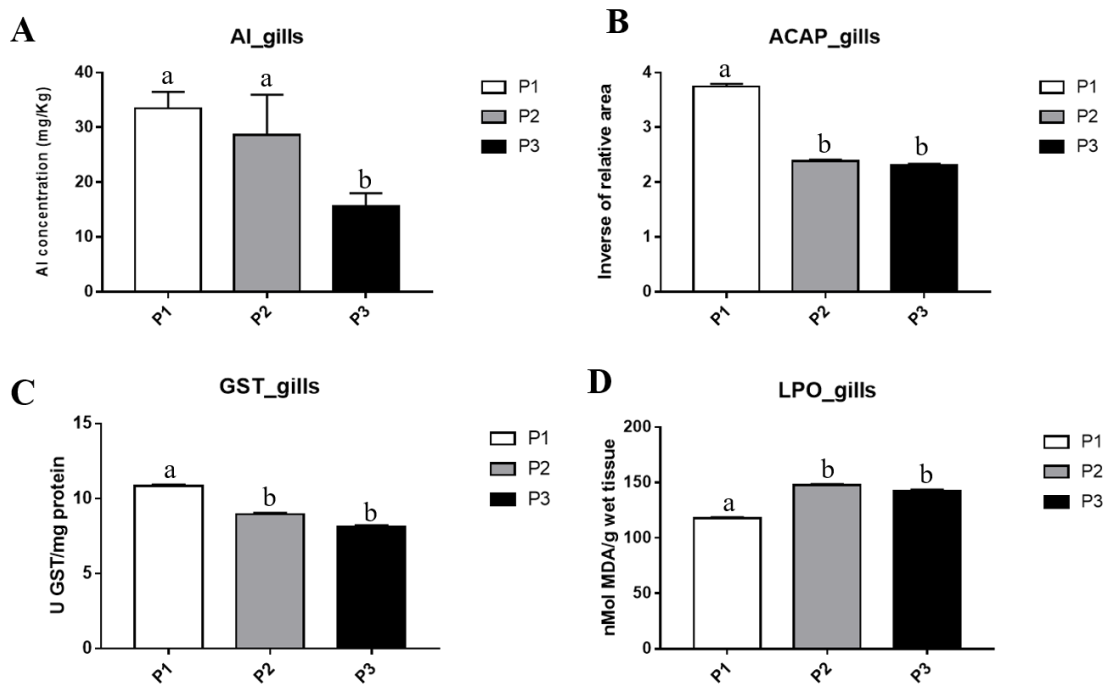


Figura 3. Concentração total de Alumínio (n=10) e biomarcadores de estresse oxidativo (n=50) em brânquias de *Bryconops caudomaculatus* coletados na bacia do rio Capim em período pós-estiagem. P1: ponto no entorno da área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre os pontos ($p < 0.05$).

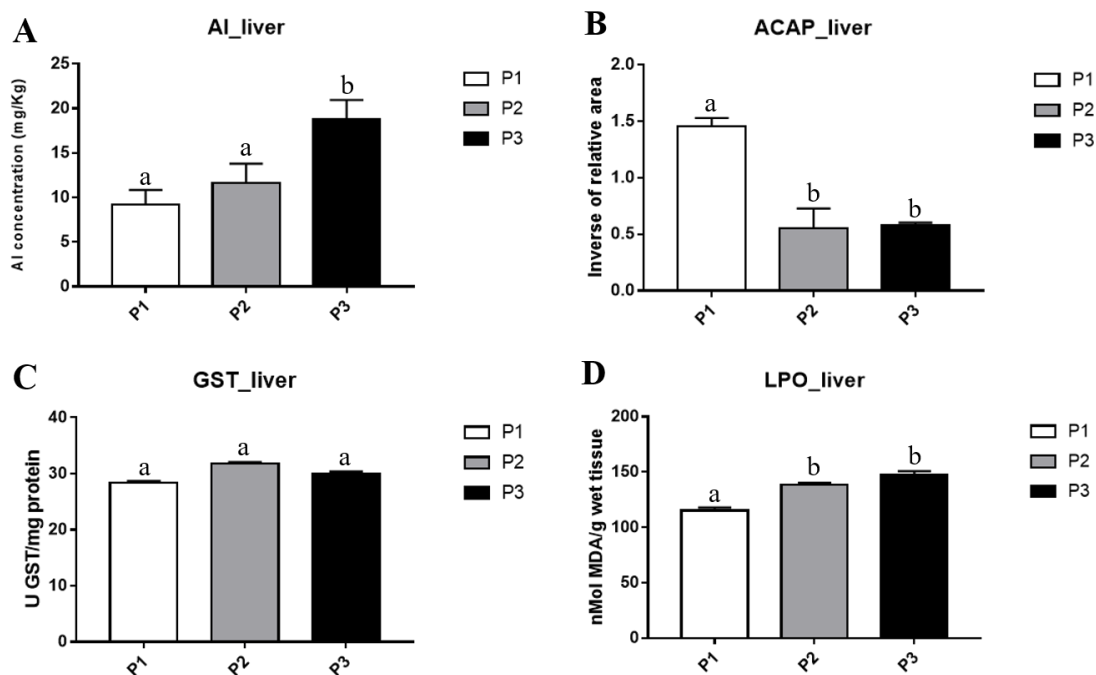


Figura 4. Concentração total de Alumínio (n=10) e biomarcadores de estresse oxidativo (n=20) em fígado de *Bryconops caudomaculatus* coletados na bacia do rio Capim em período pós-estiagem. P1: ponto no entorno da

área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre os pontos ($p < 0.05$).

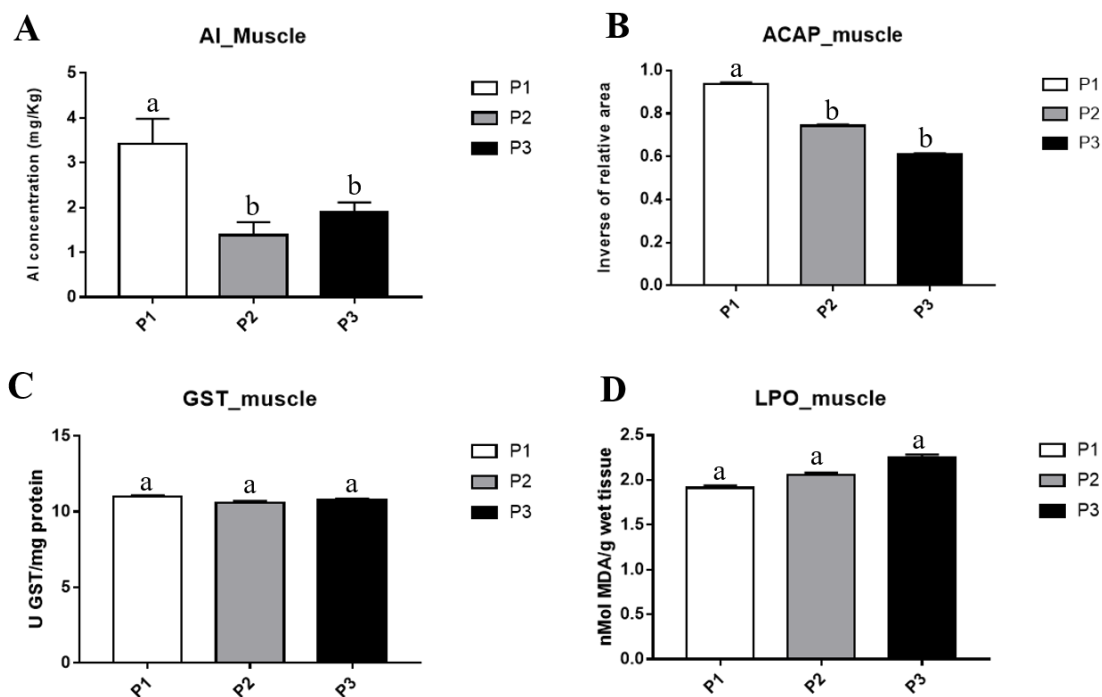


Figura 5. Concentração total de Alumínio (n=10) e biomarcadores de estresse oxidativo (n=50) em músculo de *Bryconops caudomaculatus* coletados na bacia do rio Capim em período pós-estiagem. P1: ponto no entorno da área de mineração. P2 e P3: pontos dentro da área de mineração. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre os pontos ($p < 0.05$).

4. Discussão

O Al foi encontrado em altas concentrações na água, sedimento e nos tecidos dos peixes em todos os pontos, mostrando que as altas concentrações são naturais no ambiente. Para todos os metais, a sazonalidade se mostrou constante, com maiores valores no período pós-chuvas, em consequência do histórico de chuvas nos meses anteriores a amostragem. No entanto, o Al dissolvido, fração mais importante em termos de toxicidade, teve sua sazonalidade modificada, mantendo-se elevado nos pontos dentro da mineração no período de pós-estiagem, ao contrário do que ocorreu em P1, que nesse período apresentou queda na concentração de Al dissolvido. Essa mudança no comportamento sazonal do Al dissolvido nas áreas sob maior influência da mineração pode ter refletido nos efeitos observados nos biomarcadores em *B. caudomaculatus*. Os nossos resultados de biomarcadores mostraram que mesmo em lugares onde as concentrações de Al são naturalmente altas, as respostas antioxidantes dos peixes foram acionadas dependendo do gradiente de influência da atividade de mineração. Sendo assim, a nossa hipótese foi corroborada.

Os outros metais (Ba, Cr, Mn, Ni e Pb), quando quantificados, foram encontrados em baixas concentrações e os parâmetros físico-químicos se mantiveram constantes entre os pontos de amostragem. Então consideramos que esses metais não tiveram potencialidade tóxica na espécie *B. caudomaculatus* e que os parâmetros abióticos da qualidade da água não interferiram na interpretação dos resultados dos biomarcadores. A exceção do pH ácido da água dos pontos amostrados.

A acidez é uma característica natural dos rios amazônicos de águas claras (4 a 6), em função do substrato geológico e da grande quantidade de matéria orgânica (Pascoaloto, 2006). Como a toxicidade do Al é influenciada diretamente pela acidez (Walton 2019), a acidez natural dos rios amazônicos pode aumentar a biodisponibilidade e toxicidade do Al. Em sistemas de água doce com pH baixo há uma maior formação de espécies químicas biologicamente ativas, como a forma iônica Al^{3+} (Magalhães et al., 2015) que é altamente biodisponível (Santore et al., 2018). Vários estudos investigaram a relação entre a química da água e a toxicidade do Al em organismos aquáticos e verificaram que a bioacumulação e a toxicidade aumentam com a diminuição do pH (e.g. Adams et al., 2018; De Forest et al., 2018; Gensemer et al., 2018).

Nossos resultados mostraram que houve teores de Al, um metal não essencial, nos tecidos de *B. caudomaculatus*. Os resultados indicam que o Al dissolvido na água, fração potencialmente biodisponível e mais relevante para a medição de biomarcadores, foi absorvido pelos animais e acumulado nos tecidos. Os peixes do ponto do entorno da área de mineração apresentaram maior acúmulo de Al nas brânquias e no músculo, embora a concentração do Al

dissolvido tenha sido menor no período pós-estiagem. O padrão de concentração de Al das brânquias desses peixes foi o inverso do fígado, órgão de detoxificação, que teve menor acúmulo. Esses resultados refletem o histórico de exposição crônica ao Al no ambiente. Como as brânquias de peixes, juntamente com o esqueleto e rim, são os principais órgãos-alvo para a toxicidade de Al e os mais suscetíveis (Taghizadeh et al., 2013), esse órgão possui adaptações fisiológicas para se proteger do Al, como uma superfície revestida com muco que tem alta afinidade pela forma iônica do Alumínio (Al^{3+}) (Walton 2019) para evitar sua entrada no organismo e a acumulação em outros órgãos.

Mesmo com acúmulo de Al nos tecidos, esses peixes tiveram menor Lipoperoxidação (LPO), devido ao aumento de suas respostas antioxidantes. As brânquias, fígado e músculo dos peixes do entorno tiveram uma maior Capacidade antioxidante (ACAP) e uma maior atividade da Glutathione-S-transferase (GST) nas brânquias. O sistema de defesa antioxidante desses órgãos aumentou como forma de proteção dos tecidos contra os efeitos da exposição crônica ao Al. Tais resultados mostram que o sistema antioxidante desses peixes estão adaptados às altas concentrações de Al do ambiente. Com isso, os peixes desse ponto foram capazes de evitar um maior dano oxidativo nos lipídios, pois apresentaram menor LPO nas brânquias e no fígado. O sistema de defesa antioxidante das células previne os danos oxidativos de lipídios, pois neutralizam as espécies reativas de oxigênio evitando a formação de hidroperóxidos lipídicos, que são responsáveis pela oxidação dos lipídios da membrana (Carvalho et al., 2012).

No fígado dos peixes, a concentração de Al foi maior nos peixes do ponto a jusante da mineração, onde teve maior concentração de Al dissolvido e total no período pós-estiagem. Nesse ponto há presença de sedimento de bauxita em alguns trechos na margem do rio, durante a precipitação esse sedimento inevitavelmente é transportado para o corpo aquático, o que pode ter contribuído para as altas concentrações de Al encontradas. Os peixes desse ponto, juntamente com os peixes do ponto a montante da mineração, tiveram uma diminuição das respostas antioxidantes. Os peixes de dentro da mineração tiveram menor ACAP nas brânquias, fígado e músculo, bem como uma menor atividade da GST nas brânquias. Esses resultados indicam uma exaustão das respostas antioxidantes dos animais causado pela exposição crônica ao Al. Quando o estresse crônico ultrapassa os limites de compensação, as respostas antioxidantes geralmente são esgotadas e podem até cair abaixo dos valores basais (Biagianti-Risbourg et al., 2013; Padmini and Usha Rani, 2009). Como consequência, os peixes de dentro da mineração apresentaram estresse oxidativo, pois tiveram maior LPO nas brânquias e no fígado. Uma menor eficácia da capacidade antioxidante leva a um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula, causando efeitos deletérios como a LPO (Javed et al., 2016).

Somado a isso, o Al é um agente pró-oxidante que estimula a produção de EROs na célula (Abdalla et al., 2018; Ramírez-Duarte et al., 2017) e forma complexos com grupos sulfidríla, danificando várias biomoléculas, incluindo os lipídios (Goyer, 1997).

O músculo dos peixes não foi responsivo para GST e LPO em todos os pontos, provavelmente devido às suas funções fisiológicas. O músculo é um órgão que não está envolvido na função de detoxificação, mas na função neuromuscular. Além disso, o músculo da espécie *B. caudomaculatus* possui alta contração muscular durante a natação (Cantanhêde et al., 2020). Músculo de peixes com alta atividade natatória depende principalmente da glicólise anaeróbica para seu suprimento de energia (Almeida-Val et al., 2006). Então, tecidos com metabolismo anaeróbico possuem uma menor produção de EROs (Halliwell and Gutteridge, 1999), o que explica o músculo dos peixes de todos os pontos ter apresentado menor vulnerabilidade a danos oxidativos.

Nossos resultados assemelham-se aos descritos no estudo de Montes et al. (2020) realizado em área de mineração de Ferro e Ouro na Amazônia brasileira. Os autores observaram bioacumulação de Cádmio e Mercúrio, danos histológicos e aumento da Lipoperoxidação em brânquias e músculo da piranha *Serrasalmus rhombeus*. Passos et al. (2020) também descrevem respostas semelhantes às nossos. Os autores observaram bioacumulação de Ferro e Manganês e inibição das respostas antioxidantes no fígado e nas brânquias do lambari *Astyanax lacustris* de uma área de mineração de Ferro desativada na Bacia do rio Doce (Brasil).

Observamos que as respostas bioquímicas dos peixes não diferenciaram entre os pontos localizados dentro da área de mineração, mostrando que não existe um gradiente de influência da mineração entre esses pontos. Já a presença de estresse oxidativo em brânquias e fígado de *B. caudomaculatus* refletiu o status do estresse ambiental local, do ponto de vista biológico. Fato este que não foi observado nos peixes do rio sem influência direta desta atividade. Mesmo com acúmulo de Al nos tecidos, os animais externos à área de mineração foram capazes de evitar danos oxidativo, devido a eficiente capacidade antioxidante. Dessa forma, os nossos resultados mostraram que as altas concentrações de Al não interferiram nas respostas bioquímicas dos peixes em ambas as áreas amostradas. Mas sim, o estresse ambiental gerado pela atividade mineradora, como a mudança no comportamento sazonal do Al dissolvido nas áreas sob maior influência da mineração.

Com base nos resultados obtidos neste primeiro estudo abordando efeitos em baixos níveis de organização biológica em uma região de extração de Bauxita, sugerimos que o monitoramento continuado em áreas de mineração é necessário, para se estabelecer soluções que minimizem os impactos ambientais. O uso de biomarcadores é importante e estratégico em

áreas onde há a mobilização de Al em suas formas solúveis do solo para ecossistemas aquáticos, pois essas ferramentas são respostas preditivas que podem antecipar mudanças em níveis superiores de organização biológica, como populações e comunidades, que tem alta relevância ecológica.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado (Número do processo: 88882.444779/2019-01). À *Hydro* pelo suporte financeiro através do Consórcio de Pesquisa em Biodiversidade Brasil-Noruega (BRC). Este artigo é o BRC0020 na série de publicações do BRC.

Referências

- Abdalla, RP, Kida, BMS, Pinheiro, JPS, Oliveira, LF, Martinez, CBF, Moreira, RG, 2019. Exposure to aluminum, aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 215, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.09.004>
- Adams, WJ, Cardwell, AS, De Forest, DK, Gensemer, RW, Santore, RC, Wang, N, Nordheim, E, 2018. Aluminum bioavailability and toxicity to aquatic organisms: Introduction to the special section. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37, 34-35. <https://doi.org/10.1002/etc.3879>
- Almeida-Val, VMF, Chippari-Gomes, AR, Lopes, NP, 2005. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. In: Hoar, WS, Randall, DJ, Farrell, AP (Eds), *The physiology of tropical fishes*. Vol 21. Academic Press, pp: 443-500.
- Almroth, BC, Sturve, J, Berglund, A, Förlin, L, 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 73, 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.007>
- Amado, LL, Garcia, ML, Ramos, PB, Freitas, RF, Zafalon, B, Ribas Ferreira, JL, Yunes, JS, Monserrat, JM, 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Angélica, RS, Kahn, H, Paz, SPA, 2018. A proposal for bauxite quality control using the combined Rietveld - Le Bail - Internal Standard PXRD method – Part 2: Application to a gibbsite bauxite from the Paragominas region, northern Brazil. *Minerals Engineering*. 122, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.03.039>
- Armstrong, RN, 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferase. *Chemical Research in Toxicology*. 10, 2–18. <https://doi.org/10.1021/tx960072x>
- Bainy, ACD, Saito, E, Carvalho, PSM, Junqueira, VBC, 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic toxicology*. 34, 151–162. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)

Biagianti-Risbourg, S, Paris-Palacios, S, Mouneyrac, C, Amiard-Triquet, C, 2013. Pollution acclimation, adaptation, resistance, and tolerance in ecotoxicology, in: Férard, J., Claise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Berlin, pp. 883–892.

Cantanhêde, SM, Hamoy, M, Montag, LFA, Amado, LL, 2020. Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comparative Biochemical and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology*. 228, 108653. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>

Carvalho, CS, Bernusso, VA, Araújo, HSS, Espíndola, ELG, Fernandes, MN, 2012. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*. 89, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>

Clark, MW, Johnston, M, Reichelt-Brushett, AJ, 2015. Reichelt-Brushett. Comparison of several different neutralisations to a bauxite refinery residue: Potential effectiveness environmental ameliorants. *Applied Geochemistry*. 56, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.015>

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução n. 357., 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> (Access in: 01/08/2020)

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução n. 454., 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693> (Access in: 01/08/2020)

Costa, MLD, Cruz; GS, Almeida, HDF, Poellmann, H, 2014. On the geology, mineralogy and geochemistry of the bauxite-bearing regolith in the lower Amazon basin: Evidence of genetic relationships. *Journal of Geochemical Exploration*. 146, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.07.021>

De Forest, DK, Brix, KV, Tear, LM, Adams, WJ, 2018. Multiple linear regression models for predicting chronic aluminum toxicity to freshwater aquatic organisms and developing water quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37, 8090. <https://doi.org/10.1002/etc.3922>

Exley C, House, E, 2011. Aluminum in the Human Brain. *Monatshefte fur Chemie / Chemical Monthly*. 142, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0417-y>

- Exley, C., Mold, M.J., 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 30, 90e95. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.11.002>
- Fernandes, C, Fontainhas-Fernandes, A, Ferreira, M, Salgado, MA, 2008. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz–Paramos Coastal Lagoon Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 55, 262–269. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9108-z>
- Gensemer, RW, Playle, RC, 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 29, 315-450. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>
- Goyer, RA, 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annual Review of Nutrition*. 17, 37-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.37>
- Habig, WH, Jakoby, WB, 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*. 77, 398-405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Halliwell, B, Gutteridge, JMC, 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford.
- Hermes-Lima, M, 2005. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, in: Storey, K. B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley- Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 319–368.
- Herrington, R, Mondillo, N, Boni, M, Thorne, R, Tavlan, M, 2016. *Lateritic Deposits of the Tethyan Belt, Tectonics and Metallogeny of the Tethyan Orogenic Belt*. Society of Economic Geologists, Littleton, Colorado, US, 2016.
- Hydro Paragominas, 2020. <https://www.hydro.com/pt-BR/sobre-a-hydro/a-hydro-no-mundo/south-america/brasil/paragominas/mineracao-paragominas/> (Access in: 01/12/2020).
- Instituto Evandro Chagas (IEC), 2018. Relatório técnico. Avaliação preliminar dos impactos ambientais referente ao transbordo e lançamentos irregulares de efluentes de lama vermelha na cidade de Barcarena, Estado Do Pará. <https://www.iec.gov.br/coletiva-hydro-2/> (Access in: 01/12/2020).

Javed, M, Ahmad, I, Usmani, N, Ahmad, M, 2016. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. Chemosphere. 151, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.080>

Kotschoubey B, Calaf JMC, Lobato ACC, Leite AS, Azevedo CHD, 2005. Caracterização e gênese dos depósitos de bauxita da Província Bauxitífera de Paragominas, noroeste da bacia do Grajaú, nordeste do Pará/ oeste do Maranhão. In: Marini OJ, Queiroz ET, Ramos BV (Eds.), Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia. Brasília, DNP/MCT/ Mineral-ADIMB, Cap. 11, Brasília. pp: 691-782. http://www.adimb.com.br/publicacoes_amazonia/Indice/Cap_XI.pdf (Access in: 01/08/2020)

Lottermoser, BG, 2010. Mine Wastes - Characterization, Treatment and Environmental Impacts, 3 ed. Springer, pp. 400.

Magalhães, DP, Marques, MRC, Baptista, D. Buss, DF, 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. Environmental Chemistry Letters. 13, 69-87. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0491-9>

Melo, VF; Batista, AH; Barbosa, JZ; Barbeiro, L; Gomes, R; Dultra, MTM. 2018. Soil quality and reforestation of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa Bonpl.*) after laterite-type bauxite mining in the Brazilian Amazon forest. Ecological Engineering, v.125, p. 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.10.016>

Montes, CS, Ferreira, MAP, Giarrizzo, T, Amado, LL, Rocha, RM, 2020. Evaluation of metal contamination effects in piranhas through biomonitoring and multi biomarkers approach. Heliyon. 6, e04666. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04666>

Oakes, KD, Van Der Kraak, GJ, 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aquatic Toxicology. 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00204-7)

Oliveira, VM, Assis, CRD, Costa, HMS, Silva, RPF, Santos, JF, Carvalho Jr, LB, Bezerra, RS, 2017. Aluminium sulfate exposure: A set of effects on hydrolases from brain, muscle and digestive tract of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology. 191, 101–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.002>

Padmini, E, Usha Rani, M, 2009. Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. *Science of the Total Environment*. 407, 4533–4541. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.005>

Papadopoulou, AI, Polemitou, I, Laifi, P, Yiangou, A, Tananaki, C, 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GS isoenzymes in the adult worker bee. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*. 139, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.010>

Pascoaloto, D. Hidroquímica dos rios da Amazônia., 2006. Centro Cultural dos Povos da Amazônia – CCPA, Manaus-AM.

Passos, LS, Gnocchi, KG, Pereira, TM, Coppo, GC, Cabral, DS, Gomes, LC, 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustres* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse?. *Science of the Total Environment*. 736, 139644. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>

Preez, G, Wepener, V, 2016. Influence of Mining Pollution on Metal Bioaccumulation and Biomarker Responses in Cave Dwelling Fish, *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 97, 18-23. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1799-2>

Ramírez-Duarte, WF, Kurobe, T, Teh, SJ, 2017. Impairment of antioxidant mechanisms in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) by acute exposure to aluminum. *Comparative Biochemical and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology*. 198, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.05.003>

Regoli, F, Giuliani, ME, 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*. 93,106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>

Ribeiro, MC, Moron, SE, Lopes, JM, 2017. Histological Analysis of *Bryconops caudomaculatus* gills and liver under different concentrations of ammonia. *Boletim do Instituto de Pesca*. 43(1), 35-43. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p35>

Santore, RC, Ryan, AC, Kroglund, F, Teien, HC, Rodriguez, PH, Stubblefield, WA, Cardwell, AS, Adams, WJ, Nordheim, E, 2018. Development and application of a biotic ligand model for

predicting the toxicity of dissolved and precipitated aluminum to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37, 70-79. <https://doi.org/10.1002/etc.4020>

Sheehan, D, Meade, G, Foley, VM, Dowd, CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. 360, 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>

Silva, CC, Ferreira, EJG, Deus, CP, 2008. Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon grainage, Brazil). *Neotropical Ichthyology*. 6, 237-242. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200011>

Söderholm, P, Svahn, N, 2015. Mining Regional Development and Benefit-sharing in developed countries. *Resources Policy*. 45, 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2015.03.003>

Taghizadeh, V, Imanpoor, MR, Hosseinzadeh, M, Azarin, H, 2013. Effects of acidic water in combination with aluminum on swimming behavior and survival of yolk-sac larval in Goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Springerplus*. 2,190. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-190>

Thorpe, CJ., Watve, A, 2016. Lateritic Plateaus in the Northern Western Ghats, India; a review of bauxite mining restoration practices. *Ecology and Society*. 29, 25-38. <http://dx.doi.org/10.11609/JoTT.o3038.3589-602>

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2007. Method 3051A – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf (Access in: 01/08/2020)

Van der Oost, R, Beyer, J, Vermeulen, NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Walton, JR, 2019. Bioavailable Aluminum: Its Metabolism and effects on the environment. *Encyclopedia of environmental health*. 2nd ed. pp. 328-339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11224-2>

Welz, B, Sperling, M, 1999. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim, New York.

Wingert, J; Malabarba LR, 2011. A new species of *Bryconops* (Teleostei: Characidae) from the rio Madeira basin, Northern Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 9, 471-476.

<https://doi.org/10.1590/S1679-62252011000300002>

Zar, JH, 1999. *Biostatistical analysis*. 4 Ed. Northern Illinois University. Prentice Hall. 663 pp.

CAPITULO 2

Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity

Capítulo publicado na revista Comparative Biochemistry and Physiology – Part C (Fator de impacto: 2.892), com Qualis A para Biodiversidade. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>

PERGUNTA

As técnicas de registros eletromiográfico e eletrocardiográfico em peixes são boas ferramentas na avaliação de toxicidade a xenobióticos?

HIPÓTESE

Durante a exposição a um estressor os registros eletromiográficos e eletrocardiográfico de peixes são alterados e não voltam prontamente ao estado normal pós exposição.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Descrever as técnicas de registros eletromiográfico e eletrocardiográfico de respostas normais, durante indução à toxicidade e recuperação a curto prazo na de peixe espécie amazônica *B. caudomaculatus*.

Objetivos específicos

- Descrever os registros eletromiográficos e eletrocardiográficos basais da espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Avaliar os registros eletromiográficos e eletrocardiográficos como biomarcadores de exposição a um xenobiótico;
- Validar as técnicas de eletromiograma e eletrocardiograma em peixes como ferramentas para estudos de estresse ambiental.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity



Sildiane Martins Cantanhêde^{a,b}, Moisés Hamoy^c, Luciano Fogaça de Assis Montag^{a,d},
Lílian Lund Amado^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^b Laboratório de Ecotoxicologia e Laboratório de Pesquisas em Monitoramento Ambiental Marinho, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^d Laboratório de Ecologia e Conservação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bryconops caudomaculatus
Physiology
Electromyogram
Electrocardiogram

ABSTRACT

Sublethal exposures to environmental pollutants may cause changes in physiological parameters. Thus, knowledge of basal physiological rates of the species and the development of methods to quantify these rates are extremely important. Considering the scarcity of cardiac and muscle physiological studies in native Amazonian fish species and that no evaluation of electrophysiological responses by exposure to a stressor has been reported in *Bryconops caudomaculatus*, the aim of this study was to develop techniques of electromyographic and electrocardiographic recordings of normal responses, during toxicity induction and short-term recovery. A total of 9 animals were used, divided into two groups: control group ($n = 4$) and treated group ($n = 5$), with records lasting 5 min. The results showed that the basal electromyographic records indicate that the studied species has a very intense swimming activity, whereas the basal cardiac parameters clearly showed the patterns in P wave tracing, QRS complex, T wave and Q-T and R-R intervals. During exposure to the stressor, muscle activity ceased presenting intense decrease and myorelaxant effect expected. Electrocardiographic responses confirmed cardiotoxicity with intense bradycardia, ventricular bigeminism, prolongation of QRS complex duration and cardiac arrhythmias, indicating cardiac dysfunction. It was concluded that the electrophysiological responses are excellent biomarkers and showed the susceptibility of the species to the tested substance. In addition, the electrocardiogram and the electromyogram are excellent techniques to reflect the degree of environmental stress when organisms are exposed to toxic substances in the environment.

1. Introduction

The Amazon represents the largest rainforest in the world and contains 15–20% of the global freshwater supply (Hansen et al., 2013). It is essential for maintaining the world's biodiversity, water cycling and carbon stocks (Ritter et al., 2017) and is home to a large number of freshwater flora and fauna species (Castello et al., 2013). Anthropogenic impacts in the Amazon basin increased from the 1950s, mainly in Brazil, with the construction of roads for logging, mining activities, reservoir construction and the establishment of agribusiness (Junk et al., 2007). These activities favor the increase of contaminants in the Amazon basin, which can cause toxic effects on resident organisms.

Due to lack of target specificity, most contaminants can cause severe

and persistent toxic effects in resident and non-target aquatic species, including invertebrates and vertebrates (Ohaga et al., 2007; Pereira et al., 2009; Ren et al., 2015). Knowledge and understanding of these conditions led to the development of new monitoring, analysis and evaluation technologies based on biological, physical and chemical methods (Parsons et al., 2002; Zhang et al., 2009). In this context, the use of biomarkers in resident organisms has been extensively employed in aquatic pollution studies, as it provides information on the biological effects of environmental chemicals and their possible mechanism of action (Giltrap et al., 2017). This tool detects the existence of exposure, indicating the effect and establishes the link between the stressor and its toxicity (Ryan et al., 2007).

Biomarkers are cellular, biochemical, molecular, or physiological

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecotoxicologia e Laboratório de Pesquisas em Monitoramento Ambiental Marinho, Universidade Federal do Pará, Av Augusto Correa, 01, 66075-110 Belém, Pará, Brazil.
E-mail address: lla@ufpa.br (L.L. Amado).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>

Received 1 August 2019; Received in revised form 24 October 2019; Accepted 29 October 2019

Available online 01 November 2019

1532-0456/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

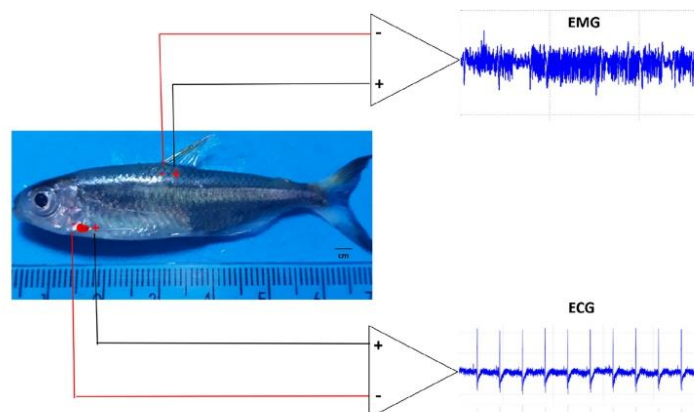


Fig. 1. Schematic drawing of the electrode implant site and connection to the signal amplifier for electromyogram (EMG) and electrocardiogram (ECG) in *Bryconops caudomaculatus* recording.

changes that are measured in cells, body fluids, tissues, or organs (Lam and Gray, 2003). The monitoring of physiological responses to stressor exposure is necessary since determining the toxicity of chemicals in organisms is essential for assessing the sensitivity of animals, as well as to assess the degree of damage and the extent of biochemical, physiological and behavioral disorders (Tabassum et al., 2016). Given this, it is important to develop tools that can assist in the early detection of effects of substances on organisms. Electrophysiology markers, such as electromyographic and electrocardiographic responses, are promising techniques in this type of evaluation.

The electromyogram detects, records and analyzes electrical signals from skeletal muscle contraction (Webster, 1988) and can measure the extent of muscle relaxation or contraction achieved during exposure to xenobiotic substances in organisms (Fujimoto et al., 2017). The electrocardiogram (ECG) consists in recording the impulses generated by the cardiac pacemaker tissue (Guimarães et al., 2003). ECG waves (P, Q, R, S, and T) and time intervals (PR, QRS, ST, and QT) were used to differentiate healthy and diseased fish (Langheinrich et al., 2003). In this study, the analysis described highlights the importance of the toxic effects of stressors on heart and muscle function for individual physiological performance and survival of the species. It emphasizes biological methods, especially physiological measurements when organisms are exposed to toxic substances.

The tailspot tetra *Bryconops caudomaculatus*, is a species of freshwater fish native of the Amazon. It is the most complex and numerous species in the Iguanodectidae family and an important food item of piscivorous species (Silva et al., 2008). Considering the scarcity of cardiac and muscle physiological studies in native Amazonian species and that no evaluation of electrophysiological responses by exposure to a stressor has ever been reported in fish species *B. caudomaculatus*, the aim of this study was to develop techniques for recording electromyographic and electrocardiographic responses during normal activity, toxicity induction and short-term recovery.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals and acclimation

The individuals used were *Bryconops caudomaculatus* specimens, coming from an area far from urbanization, in Benevides-PA, Brazil (Ministry of Environment License No. 9151-1). The animals (4.3 ± 0.231 g) were stored in aquariums and kept in photoperiod of

12 h in the experimental vivarium of the Pharmacology and Toxicology Laboratory of Natural Products at the Universidade Federal do Pará. Feeding was done twice a day with commercial ration (32% protein). Concomitant with daily siphoning for the removal of uneaten food and feces, the water was partially removed (approximately 20% of volume) and replenished with water from the same source. Water quality parameters (Temperature 26.8 °C; pH 7.5; Dissolved Oxygen > 5.0 mg/L; Ammonia 0.1 mg/L; Total Hardness 70 mg/L CaCO₃) were controlled and maintained. This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee CEUA-UFPA-CEUA No. 8293020418.

2.2. Drug used and experimental design

A xenobiotic with a known anesthetic effect was chosen as the test substance, so that it was possible to evaluate the efficacy of the developed electrocardiographic and electromyographic recording technique. The test substance for the technique used in this study is clove oil (Eugenol, Biodynamics®). Extracts derived from clove oil have been reported as stressors and aversive products with implications for animal welfare (Davidson et al., 2000; Readman et al., 2013). For being a hydrophobic product, a stock solution was prepared from its predilution in 96% ethanol at a ratio of 1:9, stored in an amber flask and kept at 4 °C until the moment of use. From this solution aliquots were taken at a concentration of 20 µL·L⁻¹ (20 ppm), where it was added directly to the water for exposure.

A total of 9 animals were used, divided into two groups: control group ($n = 4$) and treated group ($n = 5$). In each group, electromyographic and electrocardiographic recordings lasting 5 min each were made. The recovery of the animals after exposure allowed the acquisition of data in duplicate, considering that *B. caudomaculatus* are fishes from hard-to-reach region of the Amazon.

2.3. Electrophysiology markers

2.3.1. Electromyographic records (EMG)

The electrodes were constructed using two identical stainless steel rods (one serving as a reference and one for data recording) of 3.0 mm and 0.02 mm in length and diameter respectively, isolated with Teflon (Microprobe SNC-MPI-Gaithersburg, MD 20879, USA), being conjugated with a thin layer of epoxy resin. The electrodes were attached to the dorsal muscle fibers (2.0 mm below the midsection of the dorsal fin)

and their distal part connected to the high impedance amplifier (Grass Technologies P511) (Fig. 1), coupled to an oscilloscope (Protek, 6510) for data acquisition. The entire experiment was performed in a Faraday (TMC) metal screen cage. Data were continuously monitored with a 1 kHz band (National Instruments, Austin, TX) and analyzed with LabVIEW Express Software. Data were expressed graphically showing potential difference between the electrodes (reference and record) and the spectrograms were calculated using a 256-point Hamming window (256/1000 s).

2.3.2. Electrocardiographic records (ECG)

For cardiac monitoring, the electrodes were constructed in stainless steel 0.03 mm and 5.0 mm of diameter and length respectively, in a non-conjugated manner. The reference electrode clamping position followed the direction of the cardiac vector, being fixed in the ventral part 1.0 mm after the end of the opercular cavity and the recording electrode was inserted 1.0 mm below the left pectoral fin. Subsequently, the electrodes were connected to a high impedance amplifier (Fig. 1). The following items were analyzed from the record: heart rate in beats per minute (BPM), amplitude of records (mV), duration of QRS complex (s), R-R interval (s) and Q-T interval (s).

2.4. Statistical analysis

After verifying compliance with the assumptions of normality and homogeneity of variance, through the Kolmogorov-Sminov and Levene tests, comparisons of the power values averages were made by ANOVA, followed by Tukey test. Graphpad Prism 5.0 software was used for analysis and a p value < 0.05 was considered statistically significant in all cases.

3. Results

3.1. Electromyographic activity (EMG) of the *B. caudomaculatus* dorsal muscle during swimming, exposure and short-term recovery

The basal record of the electromyographic data of the tailspot tetra dorsal muscle presented high amplitude in the records. Signal strength was higher at frequencies below 30 Hz (Fig. 2A). After exposure to eugenol, the tracing showed a marked decrease in amplitude. After 100 s of exposure, muscle activity ceased, with intense decrease in recorded activity (Fig. 2B). The frequency spectrogram showed that the energy intensity was greatly reduced during contact with the stressor. During recovery, the record initially indicated low dorsal muscle activity in the first 50 s of record, then muscle activity gradually increased (Fig. 2C). The amplitude of contraction recorded is compatible with the reversibility of the myorelaxant effect, as shown by the spectrogram.

The amplitude of contraction during exposure decreased significantly showing marked loss of muscle tone. During recovery the amplitude average was smaller than the control and higher than the exposure ($p = 0,0003$; $F = 39,45$) (Fig. 3).

3.2. Electrocardiographic activity (ECG) of the *B. caudomaculatus* cardiac muscle during swimming, exposure and short-term recovery

Cardiac normality parameters in the tailspot tetra showed clearly in the tracing of the P wave (atrial depolarization), the QRS complex (ventricular depolarization) and the T wave (ventricular repolarization) (Fig. 4), showing the patterns of amplitude, duration of the QRS complex, QT Interval, R-R Interval and heart rate (Fig. 4C).

After exposure to eugenol, changes in the electrocardiographic tracings of the sampled fish were easily identified due to bradycardia and decreased amplitude (Fig. 5). Cardiac deflagrations during exposure were abruptly altered, demonstrating high sensitivity of the species to the stressor. Increased T-wave amplitude that has become inverted (ventricular bigeminism) may indicate cardiac dysfunction

during exposure (Fig. 5C). However, all outbreaks were identified, even with intense bradycardia.

During recovery, the electrocardiographic tracing of the tailspot tetra showed gradual recovery in heart rate and amplitude after 150 s of recording (Fig. 6), indicating reversibility of the condition. However, the fish were sensitive to cardiac arrhythmias even after anesthetic withdrawal. It is important to note that the T wave remained inverted, but approaching its normality (Fig. 6C).

During the exposure period, there was a significant reduction in tailspot tetra heart rates compared to the control group, but after eugenol withdrawal the reversibility of the effect was observed ($p < 0,0001$; $F = 175,3$) (Fig. 7A). Regarding to amplitude, in the exposure period, it was lower than in the other groups ($p = 0,0156$; $F = 16,23$) (Fig. 7B).

The duration of QRS complex average was longer in the recovering group ($p < 0,0001$; $F = 67,51$) (Fig. 8A), indicating late recovery and ventricular activation outside normal limits. About the R-R interval, it was higher in the treated group ($p = 0,0007$; $F = 58,03$) (Fig. 8B). The Q-T interval was shorter during exposure ($p = 0,0012$; $F = 69,56$) (Fig. 8C).

4. Discussion

Electrocardiogram (ECG) and electromyogram (EMG) have been widely used to address physiological condition as a stress index. Although numerous reports of investigations on ECGs and EMGs of aquatic organisms have been made, the differentiation of the parameters of these techniques in response to specific toxic chemicals has not been extensively studied (Song et al., 2018). The aim of this study is to show that the ECG and EMG parameters (e.g. QRS complex duration, T wave and muscle contraction) of *B. caudomaculatus* species can be used as physiological biomarkers to be applied in ecotoxicological studies, using the technique of recording these parameters by the method described in this paper.

Records of dorsal muscle basal electromyographic data indicate that *B. caudomaculatus* has a very intense swimming activity. On the other hand, the basal cardiac parameters of the fish clearly showed the patterns in the P wave tracing, the QRS complex, the T wave and the Q-T and R-R intervals. The QRS complex consists of Q-wave (down), R-wave (up) and S-wave (down) representing depolarization time and changes in cardiomyocyte potential (Harmer et al., 2011) and ventricular conduction in the evaluation of ECG-based measures (Nada et al., 2013). The T wave represents ventricular repolarization and the P wave represents atrial excitation (Mcgrath and Li, 2008).

During the recording technique test performed with eugenol exposure ($20 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), a xenobiotic with anesthetic effects (Readman et al., 2013), *B. caudomaculatus* specimens showed high hyperactivity and muscle contraction in the first 50s, which is often reported during the early stages of stressor exposure due to the irritating properties of most anesthetics in the gill tissue (Ross and Ross, 2008; Readman et al., 2013). Similar results occurred in studies with three Amazonian fish species (*Paracheirodon axelrodi*, *Heros severus* and *Pterophyllum scalare*), in which agitated behavior was reported during the early phase of eugenol exposure at a concentration of $60 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fujimoto et al., 2017), with *Rhamdia quelen* exposed to $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gomes et al., 2011) and *Colossoma macropomum* specimens exposed to $65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Roubach et al., 2005).

The frequency spectrogram showed that the energy intensity was greatly reduced during contact with the stressor, the muscle activity of the fishes ceased with myorelaxant effect. This shows the high sensitivity of *B. caudomaculatus* because a very low concentration of the stressor used in very small fish species regulated for experiments such as *Danio rerio* (Huang et al., 2010) was applied. In fish recovery after exposure, muscle activity gradually increased, showing compatible reversibility in recovery. During exposure to anesthetics, it is known that fish may reach a stage of sedation, being completely immobilized but

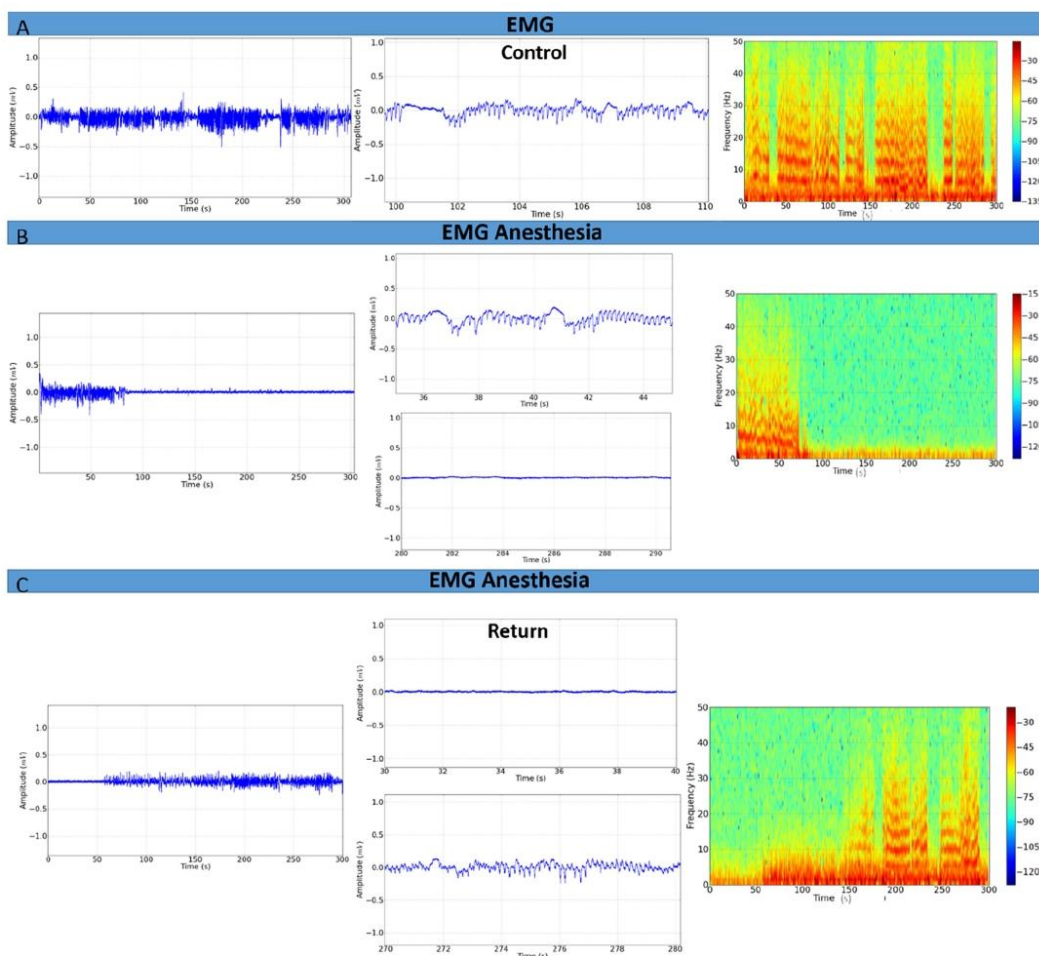


Fig. 2. Electromyographic (EMG) tracing of the *Bryconops caudomaculatus* dorsalis muscle during swimming, exposure and short-term recovery. A) Basal Records; B) fish exposed to eugenol at a concentration of 20 ppm; C) fish in recovery. Left: EMG over 300 s; Center: amplification of record fragments to observe the obtained patterns; Right: frequency spectrograms.

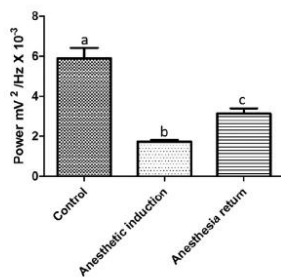


Fig. 3. Amplitude averages (average \pm SD) at frequencies up to 50 Hz in the dorsal muscle of *Bryconops caudomaculatus*. Different letters (a, b and c) above error bars denote significant differences among the groups ($p < 0.05$, $n = 9$).

conscious and still sensitive to pain (Barbas et al., 2017). Thus, the responses of skeletal muscle contraction activity quantified in this study by electromyogram, provide a much clearer view on modulation of muscle contraction power in fish exposed to anesthetic stressors or other substances.

The responses of the electrocardiographic activity of the cardiac muscle in the fish sampled proved cardiotoxicity, showing the sensitivity of the species. The evaluation of the effects of a stressor on cardiac and ventricular pacemaker tissues may further clarify the electrophysiological responses of fish exposed to toxic substances (Ross and Ross, 2008). The potential for cardiotoxicity depends on the absorption, distribution and elimination of chemicals in fish tissues (toxicokinetics), and this process varies considerably at different stages of the life cycle (Incardona and Scholz, 2016). In this study, during exposure there was intense bradycardia and increased T-wave amplitude (ventricular bigemism), which became inverted, indicating cardiac dysfunction and

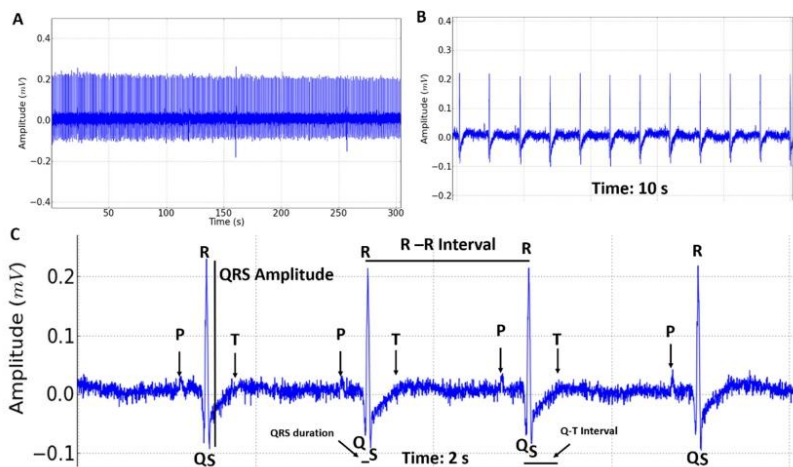


Fig. 4. Basal electrocardiographic record (ECG) of *Bryconops caudomaculatus*. A) 300 s sinus rhythm; B) amplification of 10-second ECG tracing to identify cardiac outbreaks; C) extended tracing (in 2 s) with demonstrations of P, T waves and QRS complex.

the susceptibility of fish to the stressor. Bradycardia in tailspot tetra specimens suggests an indirect consequence of a central nervous system depression or, alternatively, a combined result of the direct depressant effect of anesthetics on cardiac tissue (Souza et al., 2019). Cardiac and ventilatory rates in fish are functionally linked and, in many circumstances, are neurophysiologically synchronized (Randall, 1970).

Monteiro et al. (2017) evaluated the effects of exposure to inorganic mercury (Hg) on myocardial contractility and on the electrocardiogram (ECG) of two neotropical fish species, matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*), and observed that both acute and prolonged exposure of Hg was cardiotoxic for both fish. ECG analysis revealed that Hg impaired electrical conduction throughout the heart, inducing first-degree atrioventricular block and prolonging the plateau phase of action potential duration. In traíra, high Hg concentrations

induced marked bradycardia, increasing the duration of ventricular action potential and delaying atrial and ventricular depolarization.

In this study, after exposure, anesthetic effect reversibility was observed. However, the fish were sensitive to cardiac arrhythmias even after recovery. Toxic substances can produce sublethal effects on the heart by blocking Na^+ , K^+ and Ca^{2+} channels causing arrhythmias (Garduño-Juárez, 2012). During systole there is a higher affinity of the toxins for Na^+ channels, since they are open or inactive and it is lower in diastole, when the dissociation of ion channel molecules occurs. Since myocardial fiber has a longer depolarization period, channel affinity is favored by prolonging the presence of the substance in the myocardium and its clinical effects (Tash and Butterworth, 2006). Other anesthetics have been implicated in the induction of bradycardia in fish: *Danio rerio* anesthetized with methane sulfonate tryline (MS-

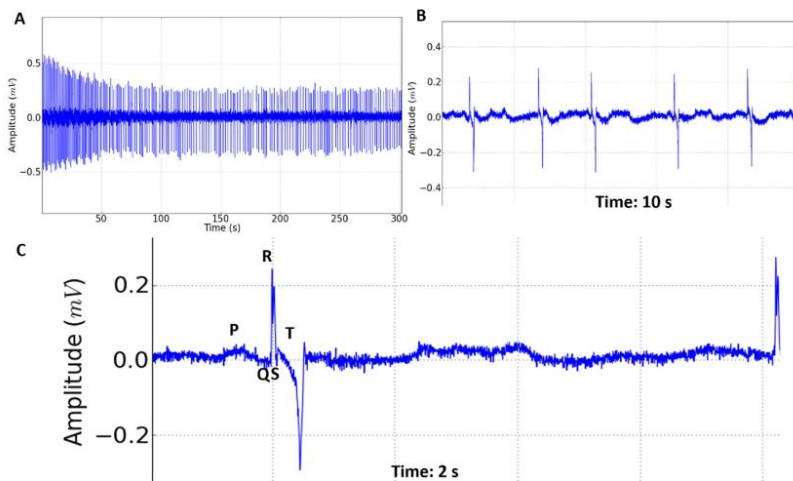


Fig. 5. Electrocardiographic recording (ECG) of *Bryconops caudomaculatus* during exposure. A) heart rate of 300 s; B) amplification of 10-second ECG tracing to identify cardiac outbreaks; C) 2 s extended tracing with demonstrations of P, T waves and QRS complex.

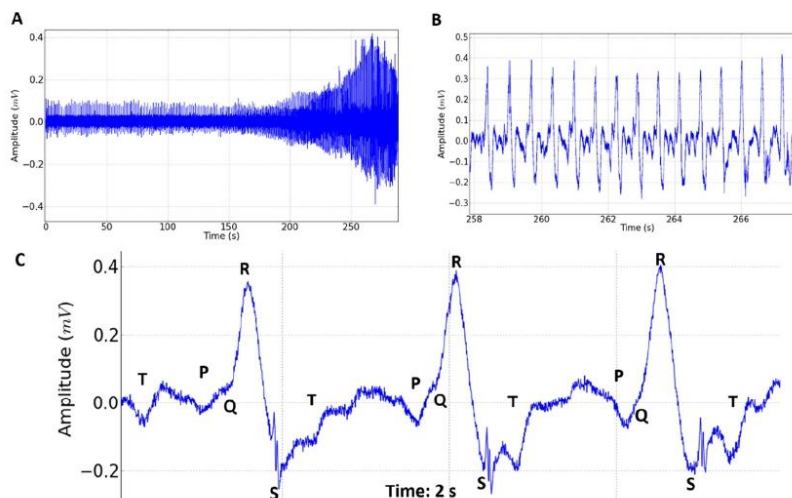


Fig. 6. Electrocardiographic recording (ECG) of *Bryconops caudomaculatus* during anesthetic recovery. A) heart rate of 300 s; B) amplification of 10-second ECG tracing to identify cardiac outbeats; C) extended tracing (in 2 s) with P and T wave demonstrations, QRS complex showing patterns in anesthetic recovery with parameters of amplitude, QRS complex duration, QT Interval, R-R Interval and heart rate.

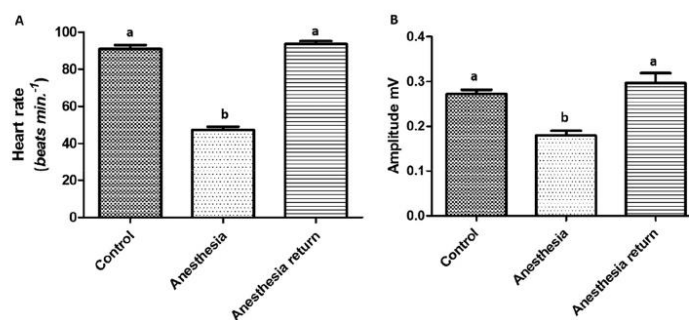


Fig. 7. Heart rate averages in beats per minute (bpm) and amplitude of *Bryconops caudomaculatus*. A) heart rate averages; B) Amplitude averages in the electrocardiographic tracing. Different letters (a and b) above error bars denote significant differences among the groups ($p < 0.05$, $n = 9$).

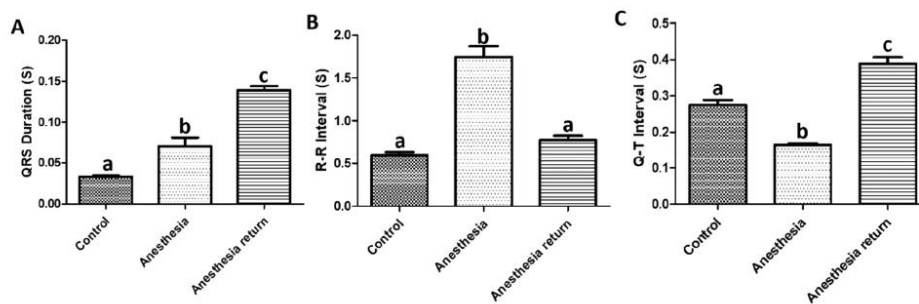


Fig. 8. Duration of QRS complex (s), R-R interval (s) and Q-T interval (s) averages in the *Bryconops caudomaculatus* heart record. A) QRS complex duration averages; B) R-R interval (s) in electrocardiographic tracing averages; C) Q-T interval duration averages (s). Different letters (a, b and c) above error bars denote significant differences between the groups ($p < 0.05$, $n = 9$).

222) (Huang et al., 2010) and Mexican sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, anesthetized with propofol (Fleming et al., 2003).

Cardiac recovery to its functions in the sampled fish was late and ventricular activation was outside normal limits due to the prolonged QRS interval duration. As one of the most important ECG parameters, QRS complex changes provide adequate information due to the accuracy of instantaneous cardiac cycle estimation, so ECG analyzes rely heavily on the QRS complex in most cases (Choi et al., 2010). It is important to emphasize that the T wave continued inverted in the *B. caudomaculatus* specimens, even after recovery, but approaching its normality.

Generally metals including Cadmium (Cd), Copper (Cu), Lead (Pb) and Potassium (K) can prolong the QRS complex in different organisms (Song et al., 2018). Specimens of Zebrafish (*Danio rerio*) treated with KCl solution by intraperitoneal injection also showed various responses in ECG parameters such as prolonged QRS interval, RR interval changes, extended P-wave, blocked atrioventricular conduction and high T-wave (Liu et al., 2016). In this same species treated with Thallium and Deltamethrin, ECG wave amplitudes were inhibited and the duration of QTS and QT intervals was prolonged (Song et al., 2018). ECG signals were also used for water quality monitoring, such as the study in *Pagrus major*, where the intervals between T and P waves were prolonged when exposed to red tide (Endo et al., 1988), and in carp (*Cyprinus carpio*), where the PQ and QT intervals were immediately shortened when exposed to sewage compounds (Kakuta and Murachi, 1997).

The results obtained confirm the susceptibility of *B. caudomaculatus* fish species, in other words, a long term exposure could have deleterious effects, since the dosage used in the treated group was very low. In fish, as in all other vertebrates, the cardiovascular system is critical for performance and survival because it ensures effective distribution / transport of oxygen and nutrients to tissues (Gamperl and Driedzic, 2009). Vertebrate survival depends on uninterrupted cardiac function and efficient cardiac output adjustments under different physiological or adverse conditions (Driedzic and Gesser, 1994). Thus, depending on the time of exposure to a certain toxic substance with cardiotoxicity effects, it can affect vital activities in fish such as swimming, foraging or reproduction.

It was concluded that the electrophysiological responses in the species analyzed were excellent biomarkers and showed the susceptibility of the fish species *B. caudomaculatus* to the substance tested. They also showed that the electrocardiogram and the electromyogram are excellent techniques to reflect the degree of environmental stress when organisms are exposed to toxic substances in the environment.

Declaration of competing interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome, except for the post-graduation grant. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

Acknowledgments

We thank Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the post-graduation grant provided to S. M. Cantanhêde (Process Number 88882.444779/2019-01).

References

- Barbas, L.A.L., Hamoy, M., Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., Lima, H.S.T., Torres, M.F., Nascimento, L.A.S., da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: a new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*. 479, 60–68.
- Castello, L., McGrath, D.G., Hess, L.L., Coe, M.T., Lefebvre, P.A., Petry, P., Macedo, M.N., Renó, V.F., Arantes, C.C., 2013. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conserv. Lett.* 6 (4), 217–229.
- Choi, S., Adnane, M., Lee, G.J., Jang, H., Jiang, Z., Park, H.K., 2010. Development of eeg beat segmentation method by combining lowpass filter and irregular r-r interval checkup strategy. *Expert Syst. Appl.* 37 (7), 5208–5218.
- Davidson, G.W., Davie, P.S., Young, G., Fowler, R.T., 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUIS™. *J. World Aquacult. Soc.* 31, 105–114.
- Driedzic, W.R., Gesser, H., 1994. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. *Physiol. Rev.* 74, 221–258.
- Endo, M., Foscarini, R., Kuroki, A., 1988. Electrocardiogram of a marine fish, *Pagrus major*, exposed to red tide plankton, *Chattonella marina*. *Mar. Biol.* 97 (4), 477–481.
- Fleming, G.J., Heard, D.J., Francis, F.R., Riggs, A., 2003. Evaluation of propofol and medetomidine-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 34, 153–158.
- Fujimoto, R.Y., Pereira, D.M., Silva, J.C.S., de Oliveira, L.C.A., Inoue, L.A.K.A., Hamoy, M., de Mello, V.J., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2017. Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish Physiol. Biochem.* 44, 245–256.
- Gamperl, A.K., Driedzic, W.R., 2009. Cardiovascular function and cardiac metabolism. In: Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology: Hypoxia*. Academic Press, pp. 301–360.
- Garduño-Juárez, M.A., 2012. Toxicidad por anestésicos locales. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 35, 578–582.
- Giltrap, M., Ronan, J., Bignell, J.P., Lyons, B.P., Collins, E., Rochford, H., McHugh, B., McGovern, E., Bull, L., Wilson, J., 2017. Integration of biological effects, fish histopathology and contaminant measurements for the assessment of fish health: a pilot application in Irish marine waters. *Mar. Environ. Res.* 129, 113–132.
- Gomes, D.P., Chaves, B.W., Becker, A.G., Baldissarro, B., 2011. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research*. 42, 878–886.
- Guimarães, J.I., Moffa, P.J., Uchida, A.H., Barbosa, P.B., 2003. Normatização dos Equipamentos e Técnicas para a Realização de Exames de Eletrocardiografia e Eletrocardiografia de Alta Resolução. *Arq. Bras. Cardiol.* 80, 225–234.
- Hansen, M.C., Potapov, P.V., Moore, R., Hancher, M., Turubanova, S.A., Tyukavina, A., Thau, D., Stehman, S.V., Goetz, S.J., Loveland, T.R., Kommareddy, A., Egorov, A., Chini, L., Justice, C.O., 2013. Townshend high-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*. 15, 850–853.
- Harmer, A.R., Valentin, J.P., Pollard, C.E., 2011. On the relationship between block of the cardiac Na⁺ channel and drug-induced prolongation of the QRS complex. *Br. J. Pharmacol.* 164 (2), 260–273.
- Huang, W., Hsieh, Y., Chen, I., Wang, C., 2010. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish*. 7, 297–304.
- Incardona, J.P., Scholz, N.L., 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquat. Toxicol.* 177, 515–525.
- Junk, W.J., Soares, M.G.M., Bayley, P.B., 2007. Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 10 (2), 153–173.
- Kakuta, I., Murachi, S., 1997. Physiological response of carp, *Cyprinus carpio*, exposed to raw sewage containing fish processing wastewater. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12 (1), 1–9.
- Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2), 182–186.
- Langheinrich, U., Vacun, G., Wagner, T., 2003. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193 (3), 370–382.
- Liu, C.C., Li, L., Yun, W.L., Situ, C.W., Cheng, S.H., 2016. Improvement of surface eeg recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. *Sci. Rep.* 6, 25–73.
- McGrath, P., Li, C.Q., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov. Today* 13 (9), 394–401.
- Monteiro, D.A., Taylor, E.W., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2017. Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 201, 26–34.
- Nada, A., Gintant, G.A., Kleiman, R., Gutstein, D.E., Gottfridsson, C., Michelson, E.L., Strnadova, C., Killeen, M., Geiger, M.J., Fiszman, M.L., Koplowitz, L.P., Carlson, G.F., Rodriguez, I., Sager, P., 2013. The evaluation and management of drug effects on cardiac conduction (PR and QRS intervals) in clinical development. *Am. Heart J.* 165 (4), 489–500.
- Ohaga, S.O., Ndiege, I.O., Kubasu, S.S., Beier, J.C., Mbogo, C.M., 2007. Susceptibility of non-target aquatic macro-invertebrates and vertebrates to (piperaceae) and (asteraceae) powder in Kilifi district, Kenya. *International Journal of Zoological Research*. 3 (2), 86–93.
- Parsons, M., Thoms, M., Norris, R., 2002. Australian river assessment system: AusRivAS physical assessment protocol. *Monitoring River Health Initiative Technical*. 22, 1–80.

- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Gonçalves, A.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18 (4), 455–463.
- Randall, D.J., 1970. The circulatory system. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology. The Nervous System. Circulation and Respiration*. vol. 4. Academic Press, New York and London, pp. 821.
- Readman, G.D., Owen, S.F., Murrell, J.C., Knowles, T.G., 2013. Do fish perceive anaesthetics as aversive? *PLoS One* 8 (9), e73773.
- Ren, Z., Zhang, X., Wang, X., Qi, P., Zhang, B., Zeng, Y., Fu, R., Miao, M., 2015. AChE inhibition: one dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere* 120, 252–257.
- Ritter, C.D., McCrate, G., Nilsson, R.H., Fearnside, P.M., Palme, U., Antonelli, A., 2017. Environmental impact assessment in Brazilian Amazonia: challenges and prospects to assess biodiversity. *Biol. Conserv.* 206, 161–168.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Roubach, R., Gomes, L.C., Fonseca, F.A.L., Val, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac. Res.* 36, 1056–1061.
- Ryan, P.B., Burke, T.A., Hubal, E.A.C., Cura, J.J., McKone, T.E., 2007. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 115 (5), 833–840.
- Silva, C.C., Ferreira, E.J.G., Deus, C.P., 2008. Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon grainage, Brazil). *Neotropical Ichthyology* 6 (2), 237–242.
- Song, J., Qiao, L., Ji, L., Ren, B., Hu, Y., Zhao, R., Ren, Z., 2018. Toxic responses of zebrafish (*Danio rerio*) to thallium and deltamethrin characterized in the electrocardiogram. *Chemosphere* 212, 1085–1094.
- Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169.
- Tabassum, H., Ashfaq, M., Khan, J., Shah, Z., Raisuddin, S., Parvez, S., 2016. Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecol. Indic.* 63, 29–36.
- Tash, M., Butterworth, J., 2006. Toxicity of local anesthetic. *ASA Refresher Courses in Anesthesiology* 34, 165–179.
- Webster, J.G., 1988. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 3th ed. John Wiley & Sons, New York.
- Zhang, D., Ding, A., Lin, X., Sun, Y., Zheng, L., Chen, C., 2009. Monitoring and assessment of water quality in rivers with biological methods. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)* 45 (2), 200–204.

CAPÍTULO 3

Cardiotoxicidade na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) por exposição aguda a diferentes concentrações de Alumínio

Capítulo a ser submetido para a revista *Aquatic Toxicology* (Fator de impacto: 4.344) com Qualis A para Biodiversidade (normas para a escrita do artigo em anexo).

PERGUNTA

O Alumínio (Al) em uma concentração ambientalmente relevante em meio ácido causa estresse oxidativo e cardiotoxicidade em peixes?

HIPÓTESE

A exposição aguda à uma concentração ambientalmente relevante de Al é capaz de gerar estresse oxidativo e alterações em parâmetros cardíacos em peixes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos agudos de diferentes concentrações de Al na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus* por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e respostas cardíacas.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos agudos do Al sobre as respostas antioxidantes (Capacidade antioxidante total e atividade da Glutathione-S-transferase) na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Avaliar os efeitos oxidativos da exposição aguda ao Al nos lipídios de membrana por meio da Lipoperoxidação na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Avaliar os efeitos agudos do Al sobre os registros cardíacos da espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus*;
- Quantificar as concentrações de íons e Al total na água;
- Quantificar as concentrações de Al total no músculo dos peixes.

ARTIGO CIENTÍFICO

Cardiotoxicidade na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus* por exposição aguda a diferentes concentrações de Alumínio

Sildiane Martins Cantanhêde^{afg}, Irina Sofia Cardoso de Carvalho^{afg}, Moisés Hamoy^b, José Augusto Martins Corrêa^c, Leandro Machado de Carvalho^d, Luciano Fogaça de Assis Montag^{ae}, Lílian Lund Amado^{afg*}

^aPrograma de Pós-graduação em Ecologia aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

^bLaboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brasil.

^cLaboratório de Hidroquímica, Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brasil.

^dLaboratório de Análises Químicas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^eLaboratório de Ecologia e Conservação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

^fLaboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

^gLaboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

*Autor para correspondência: Lílian Lund Amado. E-mail: lilian.amado@gmail.com; Telefone: +55 91 991765500. Laboratório de Ecotoxicologia (sala 327), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá. 66075110. Belém, Pará, Brasil.

Destaques

- Em menor concentração (0.3 mg/L), o Al interfere no automatismo das células cardíacas de *Bryconops caudomaculatus*.
- Em maior concentração (3 mg/L), o Al causa bloqueio atrioventricular em *B. caudomaculatus*, com indícios de parada cardíaca.
- A exposição aguda ao Al não gerou estresse oxidativo em *B. caudomaculatus*.

Resumo

Avaliamos os efeitos agudos de diferentes concentrações de Alumínio (Al) na espécie de peixe amazônica *Bryconops caudomaculatus* por meio de respostas cardíacas e biomarcadores de estresse oxidativo. Os peixes foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle em pH neutro (Ctr N pH); grupo controle em pH ácido (Ctr A pH) e dois grupos de exposição em pH ácido com 0,3 mg/L e 3 mg/L de Al. Amostras de água do meio experimental foram coletadas nos tempos experimentais (0h, 24h e 48h) para análise de Al total e para análise dos íons Cloreto (Cl⁻), Nitrato (NO₃⁻), Fluoreto (F) e Sulfato (SO₄²⁻). Al total também foi analisado no músculo dos peixes. Os biomarcadores bioquímicos analisados foram a Capacidade antioxidante total (ACAP), Glutathione S-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO) em brânquias, fígado e músculo. Os parâmetros cardíacos analisados foram a frequência cardíaca, duração do complexo QRS e dos intervalos PQ, RR e QT. A concentração da maioria dos íons se manteve constante e a concentração de Al total foi maior nos grupos de exposição nos tempos experimentais. Também foi observado uma maior concentração de Al total no músculo dos animais expostos ao Al, indicando a biodisponibilidade do metal no meio experimental. A exposição ao Al não gerou estresse oxidativo nas brânquias, fígado e músculo, mas causou cardiotoxicidade em *B. caudomaculatus*. Os peixes expostos a menor concentração de Al (0,3 mg/L) apresentaram prolongamento acentuado do intervalo PQ, interferindo no automatismo das células cardíacas e os peixes expostos a maior concentração de Al (3 mg/L) apresentaram ausência da onda P, indício de bloqueio atrioventricular. Concluímos que a exposição aguda ao Al em concentração ambientalmente relevante gerou toxicidade para as funções cardíacas de *B. caudomaculatus* em meio ácido, pois causou alterações nos registros cardíacos em ambas as concentrações utilizadas. Os nossos resultados ajudam no entendimento dos efeitos da combinação de Al e baixo pH sobre os peixes, principalmente em ecossistemas de água doce que possuem altas concentrações de Al biodisponível, em consequência do pH naturalmente baixo e das altas concentrações de Al oriundos de formações geológicas, como na bacia do rio Capim da Amazônia Oriental brasileira.

Palavras-chave: Eletrocardiograma; Respostas antioxidantes; Lipoperoxidação.

1. Introdução

O alumínio (Al) é o elemento metálico mais abundante na crosta terrestre, ocorrendo na forma combinada de silicatos, óxidos e hidróxidos (Exley and House, 2011). Na região da Amazônia, os solos são naturalmente ricos em Al, devido a constituição geomorfológica da região, composta por grande concentração de hidróxido de Al (Kotschoubey et al., 2005). As atividades antropogênicas podem aumentar a concentração de Al nos meios ambientais por promover sua mobilização de estoques naturais (Lottermoser, 2010). Na região amazônica, onde a atividade de mineração de bauxita é bem desenvolvida (Angélica et al., 2018), o processamento do minério pode mobilizar o Al do solo para o ambiente aquático (Clarck et al., 2015). Como os riachos amazônicos possuem águas ácidas (Pascoaloto, 2006), condição que favorece a biodisponibilidade do Al, é importante saber os efeitos que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes deste metal gera nos organismos nativos.

Em meio ácido, o Al se solubiliza e se torna potencialmente mais tóxico para a biota aquática (Igbokwe et al., 2019). Por não ter função biológica nas células e não existir vias para a sua metabolização e excreção, o Al é facilmente bioacumulado (Exley and Mold, 2015). Na célula, o Al é um agente pró-oxidante, ou seja, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Walton, 2019). O desequilíbrio entre a produção e a neutralização das EROs, levando a danos em biomoléculas essenciais como lipídeos, DNA e proteínas, caracteriza o estresse oxidativo. Este pode ocorrer pelo excesso de produção de espécies reativas e/ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes no interior da célula (Hermes-Lima, 2005). O Al também causa alterações fisiológicas nos organismos (Laitinen and Valtonen, 1995), as mais comuns estão relacionadas às alterações cardiovasculares, pois o Al pode bloquear os canais iônicos das células cardíacas (Nayak, 2002).

Nesse contexto, o uso de biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo e de parâmetros do eletrocardiograma (ECG) são ferramentas promissoras na avaliação da toxicidade do Al. Os biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo incluem respostas antioxidantes e danos oxidativos. As respostas antioxidantes podem ser medidas através da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP, do inglês *Total Antioxidant Capacity Against Peroxyl Radicals*), um biomarcador que mede de forma integrada a capacidade antioxidante total do animal de neutralizar os radicais peroxil gerados pela exposição a contaminantes (Amado et al., 2009). Outro biomarcador

importante para medir a eficiência do sistema antioxidante dos organismos é a atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST) (Zamek-Gliszczynski et al., 2006). A GST está envolvida no transporte de compostos reativos que exercem funções antioxidantes indiretas nas células (Salinas; Wong, 1999) e facilita a eliminação de subprodutos derivados de processos oxidativos (Sheehan et al., 2001). Os biomarcadores de estresse oxidativo incluem também os danos oxidativos causados pelo aumento desproporcional das EROs em relação ao incremento das defesas antioxidantes, em decorrência da exposição a contaminantes. A peroxidação lipídica (LPO) é um biomarcador de efeito muito utilizado para verificar se os organismos estão sofrendo estresse oxidativo devido à alguma condição à que estejam expostos (Javed et al., 2016). Como o Al é um agente pró-oxidante (Walton, 2019), as EROs produzidas pela exposição causam LPO em peixes (Oliveira et al., 2017; Abdalla et al., 2018).

A associação de biomarcadores bioquímicos à fisiológicos é extremamente útil para a verificação da condição integral do organismo, em baixos níveis de organização biológica. Neste sentido, a utilização dos registros do eletrocardiograma (ECG) como um biomarcador fisiológico favorece um diagnóstico mais preciso frente à ação de agentes tóxicos. O ECG fornece um gráfico que representa a atividade elétrica do coração, e também fornece uma voltagem de tempo do batimento cardíaco (Goldberger, 2012). O uso e descrição da análise do ECG na avaliação da toxicidade de substâncias ocorre através de registros cardíacos como as ondas P e T, duração do complexo QRS (despolarização ventricular) e dos intervalos PR, ST e QT (Choi et al., 2010). Embora vários relatos de investigações do ECG de organismos aquáticos tenham sido realizados na análise da toxicidade de substâncias (Xing et al., 2017), a diferenciação dos parâmetros de ECG em resposta a elementos químicos tóxicos específicos não foi amplamente estudada (Song et al., 2018).

A espécie de peixe *Bryconops caudomaculatus* (Günther 1864) pertencente à família Iguanodectidae (Characiformes), mede até 12cm de comprimento padrão e é uma espécie pelágica e insetívora (Silva et al., 2008), é conhecida popularmente como tetra, lambari, piaba ou tambiú. Habitam riachos costeiros das bacias do Guiana, Orinoco e Amazonas (Costa-Pereira and Severo-Neto, 2012). É utilizada para o consumo humano ou para alimentação de outras espécies aquáticas (Ribeiro et al., 2017). Até o presente momento, nenhum estudo investigou o impacto toxicológico do Al sob as respostas bioquímicas e a função cardíaca de peixes amazônicos.

Diante disso, avaliamos os efeitos agudos de diferentes concentrações de Al na espécie de peixe amazônica *B. caudomaculatus* por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e respostas cardíacas. O estudo é baseado na hipótese de que a exposição aguda à uma concentração ambientalmente relevante de Al é capaz de gerar estresse oxidativo e alterações em parâmetros cardíacos na referida espécie de peixe amazônica.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta dos peixes e aclimatação

Os peixes adultos da espécie *Bryconops caudomaculatus* foram coletados com rede de arrasto em um riacho livre de processos de urbanização, localizado na bacia do rio Taiassuí (PA, Brasil). A coleta dos peixes foi autorizada pelo órgão do governo federal SISBIO – ICMBIO (nº 63470-1) e o experimento autorizado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Pará (nº 1987120919 – ID 001309).

Os peixes coligidos foram acondicionados em recipientes com aerador e água do riacho e transportados ao Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR) da Universidade Federal do Pará (UFPA), para a aclimatação. Os peixes foram aclimatados por um mês em aquários contendo 36 L de água da torneira filtrada, com filtro biológico, aeração e fotoperíodo de 12C:12E. O tempo prolongado de aclimatação teve como objetivo reduzir a interferência do Al que potencialmente estivesse acumulado nos organismos que foram coletados em ambiente natural. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com ração comercial (32% de proteína). Diariamente foi realizada a sifonagem para a retirada de alimento não consumido e fezes, e a água renovada (70%) uma vez por semana.

2.2 Substância química e desenho experimental

A solução de Al foi obtida utilizando Sulfato de Alumínio [Al₂ (SO₄)₃] da marca DINÂMICA[®]. Uma solução estoque foi preparada com concentração nominal de 162 mg/L de Al (pH 2,5) e concentração medida de 181,5 mg/L. Da solução estoque foram preparados meios de exposição nas concentrações de 0,3 mg/L de Al, considerada uma concentração ambientalmente relevante, baseado em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em riachos de área de mineração de bauxita na Amazônia Oriental (em revisão); e na concentração de 3 mg/L de Al, para verificar efetivamente os efeitos.

No Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais da UFPA, os peixes foram divididos em quatro grupos experimentais com quatro réplicas cada, da

seguinte forma: a) Grupo controle em pH neutro (Ctr N pH); b) Grupo controle em pH ácido (Ctr A pH); c) Grupo exposição com 0.3 mg/L de Al em pH ácido (0,3 mg/L Al); d) Grupo exposição com 3 mg/L de Al em pH ácido (3 mg/L Al). O pH neutro foi estabelecido em 7.0 e o pH ácido em 5.7. Como o Al é insolúvel em pH de 6 a 8 (Driscoll and Schecher, 1990; Gensemer and Playle, 1999), um grupo exposição em pH neutro não foi necessário, já que nesta condição o Al tende a não estar biodisponível (Exley and Mold, 2015). Os meios experimentais foram preparados em água mole, com teores de Cálcio de $18,1 \pm 1,2$ mg/L (n=8) e de Magnésio de $3,1 \pm 0,4$ mg/mL (n=8), para evitar a competição desses íons com o Al no processo de absorção pelos organismos. Um total de 32 peixes foram utilizados no experimento, sendo 8 peixes por grupo experimental.

Os peixes foram expostos por 48 horas e mantidos em jejum durante todo o período experimental. Os meios experimentais foram renovados (70%) a cada 24h. Para a renovação, os meios foram preparados 24h antes sob aeração constante. Durante o experimento, as variáveis físico-químicas da água foram medidas e controladas: Temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 0,97$), pH ($7,0 \pm 0,71$ e $5,7 \pm 0,45$), Oxigênio dissolvido ($7\text{mg/L} \pm 0,61$), Condutividade ($292\mu\text{S/cm} \pm 81,8$) e Turbidez ($146\text{TDS} \pm 40,7$).

Amostras de água do meio experimental foram coletadas nos tempos 0h, 24h e 48h em frascos plástico, acidificadas com ácido nítrico (65%) e armazenadas em freezer para análise das concentrações de Al total e para análise das concentrações dos íons Cloreto (Cl^-), Fluoreto (F^-), Sulfato (SO_4^{2-}) e Nitrato (NO_3^-). Para as análises de íons, as amostras foram filtradas a vácuo com filtro de membrana $0,45\ \mu\text{m}$.

Após o término do experimento, os peixes foram crioanestesiados por um minuto e depois transportados para recipientes com água em temperatura ambiente para a avaliação do eletrocardiograma durante cinco minutos. Em seguida, os peixes foram eutanasiados, medidos ($8,4 \pm 1,5$ cm), pesados ($7,8 \pm 3,7$ g) e dissecados para a retirada das brânquias, fígado e músculo para as análises bioquímicas. Amostras de músculo foram separadas para a análise de Al total.

2.3 Análises químicas

As análises nas amostras de água dos ânions Cl^- , NO_3^- , F^- e SO_4^{2-} foram determinadas por meio de metodologias recomendadas pela APHA (1995) e CETESB (1978) no Laboratório de Hidroquímica da UFPA. A determinação das concentrações dos ânions foi realizada por cromatografia líquida, com cromatógrafo de íons Dionex DX-120. Utilizou-se coluna aniônica (ASRS ULTRA-AS14 Dionex), a solução 3,5 mM

$\text{Na}_2\text{CO}_3/1,0 \text{ mM NaHCO}_3$ como eluente e fluxo $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. As concentrações dos analitos foram calculadas em mg/L.

As análises de metais foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS) por espectrometria de absorção atômica, utilizando técnicas de atomização por chama e forno de grafite (NOVAA 300 e Analytik Jena Zenit 600), de acordo com Welz and Sperlingo (1999). As amostras de músculo foram acidificadas com 10 mL de ácido nítrico P.A. (65%) e aquecidas até a digestão completa. Durante o aquecimento, foi adicionado 3 mL de peróxido de hidrogênio (50%). Após a digestão total, as amostras foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q) e analisadas de acordo com as metodologias validadas para cada elemento. As amostras de água foram analisadas diretamente, sem processamento ou diluição.

A concentração do Al total foi calculada em $\mu\text{g/L}$ (ppb) para água e mg/kg (ppm) para músculo. O limite de quantificação foi 1,06 para Al total na água e 0,03 para Al total no músculo. As metodologias foram revalidadas utilizando amostras certificadas pelo National Institute of Standards and Technology (NIST) e pelo European Reference Materials (ERM). A determinação da exatidão das metodologias utilizou materiais certificados pelo NIST e pelo ERM: Standard Reference Material 1640a para água e Reference Material BCR® – 414 para tecido.

2.4 Análises bioquímicas

No Laboratório de Ecotoxicologia da UFPA, as amostras de tecidos foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão com pH 7,5, segundo o método de Bainsy et al. (1996) para a análise dos biomarcadores Capacidade antioxidante total (ACAP), atividade da Glutathione-S-transferase (GST) e a Lipoperoxidação. Os homogeneizados foram centrifugados a $20.000 \times g$ por 20min a 4°C e o sobrenadante removido para as análises. Para a relativização dos resultados de GST e diluição dos tecidos para a análise da ACAP, foi determinado a quantidade de proteínas totais das amostras por meio do teste de Biureto com kit comercial (Doles LTDA).

Para a análise da ACAP seguiu-se o método de Amado et al. (2009), em que determina a capacidade antioxidante das amostras com e sem exposição a um gerador de radicais, o peróxido 2'2'-azobis-2-metilpropionamida dihidroclorato (ABAP, 4nM), usando 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) como substrato. Os radicais peróxido são produzidos por decomposição térmica (37°C) do ABAP. Na presença dos radicais peróxido o $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ intercepta os elétrons dos radicais e gera um fluorocromo, que é detectado

utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525nm para excitação e emissão, respectivamente. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão menor formação de radicais peroxil. Os resultados foram expressos como o inverso da área relativa.

A análise da atividade da GST foi de acordo com o método descrito por Habig and Jakoby (1981), em que avalia a conjugação de Glutathiona reduzida (GSH, 1 μ M) com o substrato 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, 1 μ M), processo catalisado pela enzima GST presente na amostra. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima de 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Como meio de reação foi utilizado tampão Fosfato 0,1 M, pH 7,0. Os resultados foram expressos em UGST/mg de proteína, que representa a quantidade necessária da GST para catalisar a conjugação de 1 μ Mol de CDNB/min/mg de proteína.

A Lipoperoxidação foi determinada pelo método para fluorimetria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Oakes and KraaK (2003). Este método quantifica um subproduto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). No ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a uma temperatura de 95°C, formando o complexo MDA-TBA₂, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553 nm para emissão e excitação, respectivamente. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como antioxidante para as amostras e 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. O Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8.1%) foi utilizado como surfactante e o n-Butanol para separar a fase orgânica da inorgânica. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido.

2.5 Eletrocardiograma

A técnica de registros eletrocardiográficos foi de acordo com Cantanhêde et al. (2020). A posição de fixação do eletrodo de referência obedeceu a direção do vetor cardíaco, sendo fixado na parte ventral, 1,0 mm após o termino da cavidade opercular e o eletrodo de registro foi inserido 1,0 mm abaixo da nadadeira peitoral esquerda. Posteriormente, os eletrodos foram conectados a um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, Modelo P511) ligados a um sistema de aquisição de dados digital com filtragem de 0,3 e 300 Hz, com amplificação de 2000X e monitorados com um osciloscópio (ProteK, Modelo 6510).

Os dados foram monitorados continuamente com uma faixa de 1KHz (National Instruments, Austin, TX) e processados com o software especializado (LabVIEW express). As análises dos registros eletrocardiográficos foram feitas durante 5 minutos e os sinais dos registros foram observados em 1000 amostras por segundo. Os seguintes parâmetros cardíacos foram analisados: frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM), duração do complexo QRS (s) e dos intervalos PQ (s), RR (s) e QT (s).

2.6 Análise estatística

Os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados foram testados com os testes Shapiro-Wilks e Levene, respectivamente. Para dados paramétricos foram utilizadas as análises de variância ANOVA - one way (para testar a diferença significativa dos dados de biomarcadores e de Al no músculo entre os grupos experimentais) e ANOVA two-way (para testar a diferença significativa dos dados de Al total e dos íons entre os tempos de exposição e os grupos experimentais) com comparação dos resultados por meio do teste *post-hoc* de Tukey, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para dados não paramétricos as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Nemenyi. Neste caso os dados foram expressos como mediana \pm 1º quartil. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5% (Zar, 1999).

Comparamos Al total e íons das águas experimentais para verificar se esses parâmetros da qualidade da água variaram ou não entre os tempos experimentais. Para Al e biomarcadores nos tecidos, comparamos os grupos controles entre si para verificar se a acidez interferiu nos resultados. O grupo controle ácido com os grupos de exposição para verificar os efeitos do Al em meio ácido. E os grupos de exposição entre si para verificar se há uma resposta concentração dependente.

3 Resultados

3.1 Concentrações de Íons na água

A maioria das concentrações dos íons se manteve constante nas amostras de água nos tempos experimentais (0h, 24h e 48h) e Fluoreto não foi detectado nas amostras de água (Tabela 1). As concentrações de Cloreto (Cl^-) não teve diferença entre os grupos experimentais em todos os tempos (0h: $H=9,1750$, $p=1,0271$; 24h: $F=12,491$, $p=0,0612$; 48h: $F=4,0501$, $p=0,0663$).

A concentração de Sulfato (SO_4^{2-}) não teve diferença entre o grupo controle neutro e o grupo controle ácido nos tempos experimentais (0h: $F= 1042,19$, $p= 0,9999$; 24h: $H= 10,1125$, $p= 1,0000$; 48h: $F= 42,5062$, $p=0,9173$). O grupo controle ácido não teve diferença na concentração de SO_4^{2-} em relação ao grupo exposição 0.3mg/L Al (0h: $F= 1042,19$, $p=0,4413$; 24h: $H= 10,1125$, $p=1,0000$; 48h: $F= 42,5062$, $p=0,9934$). Mas, foi menor do que o grupo 3mg/L Al Al (0h: $F= 1042,19$, $p=0,00019$; 24h: $H= 10,1125$, $p=0,0339$; 48h: $F= 42,5062$, $p=0,00019$). A concentração de SO_4^{2-} no grupo exposição 0.3mg/L Al foi menor que o grupo 3mg/L Al em todos os tempos experimentais Al (0h: $F= 1042,19$, $p=0,00019$; 24h: $H= 10,1125$, $p=0,0431$; 48h: $F= 42,5062$, $p=0,0002$).

A concentração de Nitrato (NO_3^-) do grupo controle ácido foi maior em relação a ao grupo controle neutro nos tempos experimentais (0h: $F= 50112,0$, $p= 0,00019$; 24h: $F= 341,175$, $p= 0,00019$; 48h: $F= 330,51$, $p= 0,00019$). O grupo controle ácido não teve diferença na concentração de NO_3^- em relação a ambos os grupos de exposição nos tempos experimentais (0h: $F= 50112,0$, $p= 0,0824$; 24h: $F= 341,175$, $p= 0,9885$; 48h: $F= 330,51$, $p= 0,9682$ / 0h: $F= 50112,0$, $p= 0,9978$; 24h: $F= 341,175$, $p= 0,0853$; 48h: $F= 330,51$, $p= 0,0612$, para 0,3mg/L e 3mg/L respectivamente). Exceto no tempo 48h, que foi maior em relação ao grupo exposição 3mg/L Al ($F= 330,51$, $p= 0,011899$). A concentração de NO_3^- no grupo exposição 0,3mg/L Al foi maior que o grupo 3mg/L Al em todos os tempos experimentais (0h: $F= 50112,0$, $p= 0,00019$; 24h: $F= 341,175$, $p= 0,00029$; 48h: $F= 330,51$, $p= 0,0405$).

Tabela 1. Concentrações de íons das amostras de água dos grupos experimentais nos tempos 0h, 24h e 48h. Valores expressos em média e erro padrão.

Grupo experimental	Cloreto (Cl^-)			Sulfato (SO_4^{2-})			Nitrato (NO_3^-)		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
Ctr N pH	9,0±0,2	13,5±3,2	13,9±4,1	4,8±0,3	6,5±0,8	7,7±1,8	27,9±0,6	38,6±6,3	30,0±2,1
Ctr A pH	8,0±0,3	15,5±4,3	16,3±2,8	4,4±0,2	6,7±0,2	8,5±1,4	96,1±3,2 ⁺	122,0±3,6 ⁺	134,6±4,6 ⁺
0,3mg/L Al	9,7±0,4	16,9±3,0	13,1±0,1	5,1±0,5*	7,3±0,5*	8,0±0,7*	103,6±1,8 ⁺ *	130,9±3,7 ⁺ *	136,1±9,5 ⁺ *
3mg/L Al	8,5±0,4	14,3±0,4	13,5±2,4	11,9±0,8 ^{##} *	16,5±0,3 ^{##} *	19,4±2,3 ^{##} *	88,3±4,1 ⁺ *	113,2±2,2 ⁺ *	111,0±3,6 ^{##} *

Ctr N pH: Grupo controle neutro; Ctr A pH: Grupo controle ácido; +: diferença estatística com Ctr N pH; #: diferença estatística com Ctr A pH; *: diferença estatística entre os grupos de exposição.

3.2 Concentrações de Alumínio na água e no músculo de *B. caudomaculatus*

As concentrações de Al total das amostras de água não tiveram diferença entre o grupo controle ácido e o grupo controle neutro em todos os tempos experimentais (0h: $H= 8,9866$, $p= 1,0000$; 24h: $F= 68,8578$, $p= 0,9996$; 48h: $F= 39,008$, $p= 1,2872$). A

concentração de Al total em ambos os grupos de exposição, foi maior em relação ao grupo controle ácido em todos os tempos (0h: $H= 8,9866$, $p= 0,0225$; 24h: $F= 68,8578$, $p= 0,0274$; 48h: $F= 39,008$, $p= 0,0007$ / 0h: $H= 8,9866$, $p= 0,0360$; 24h: $F= 68,8578$, $p= 0,0002$; 48h: $F= 39,008$, $p= 0,0002$, para 0,3mg/L e 3mg/L respectivamente). Al total do grupo exposição 3mg/L foi maior em relação ao grupo exposição 0,3mg/L nos tempos experimentais (0h: $H= 8,9866$, $p= 0,0457$; 24h: $F= 68,8578$, $p= 0,0003$; 48h: $F= 39,008$, $p= 0,0189$) (Fig. 1A).

O conteúdo de Al no músculo dos peixes foi concentração dependente (Fig. 1B), demonstrando a biodisponibilidade do Al nos meios experimentais. A concentração de Al total no músculo não teve diferença entre o grupo controle ácido e o grupo controle neutro ($F= 5,4933$, $p= 0,6344$). A concentração de Al total no músculo dos peixes de ambos os grupos de exposição, foi maior em relação ao grupo controle ácido (0,3mg/L: $F= 5,4933$, $p= 0,0448$; 3mg/L: $F= 5,4933$, $p= 0,0271$). Al total no músculo dos peixes do grupo exposição 3mg/L foi maior em relação ao grupo exposição 0.3mg/L ($F= 5,4933$, $p= 0,00116$).

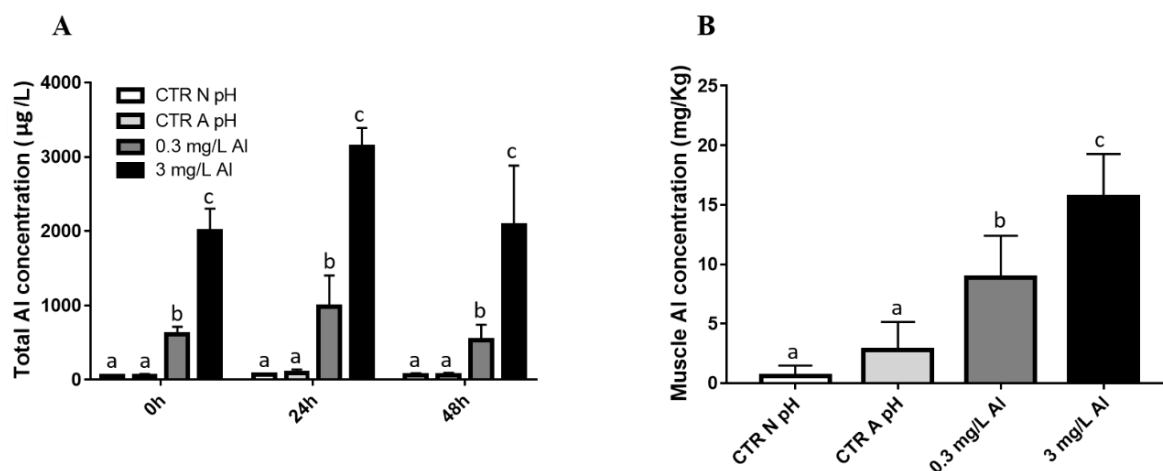


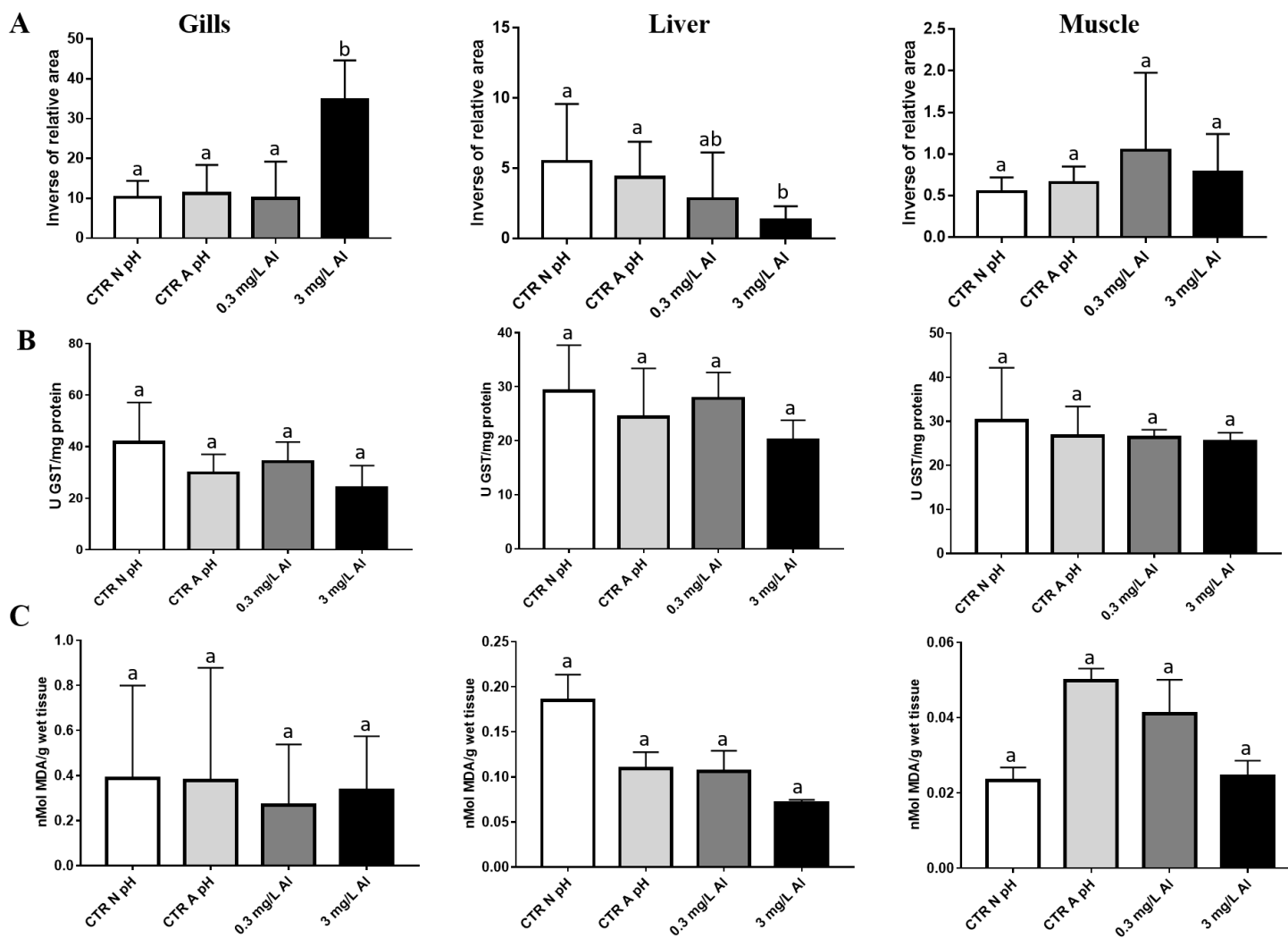
Figura 1. (A) Concentração de Alumínio total nas amostras de água dos grupos experimentais nos tempos 0h, 24h e 48h; (B) concentração de Alumínio no músculo dos animais expostos após 48h. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

3.3 Biomarcadores de estresse oxidativo em *B. caudomaculatus*

A Capacidade antioxidante total (ACAP) nas brânquias e fígado dos peixes não teve diferença entre o grupo controle ácido e o grupo controle neutro (Brânquias: $F= 9,4501$, $p= 0,9979$; Fígado: $F= 2,7807$, $p= 0,9121$). Nos peixes expostos a 0.3mg/L Al, a

ACAP nas brânquias e fígado não teve diferença em relação ao grupo controle ácido (Brânquias: $F= 9,4501$, $p= 0,9968$; Fígado: $F= 2,7807$, $p= 0,9997$). Mas, os peixes expostos à concentração de 3mg/L Al apresentaram maior ACAP nas brânquias em relação ao grupo controle ácido ($F= 9,4501$, $p= 0,00632$) e ao grupo exposição 0.3mg/L Al ($F= 9,4501$, $p= 0,0075$). Já no fígado, esses peixes apresentaram menor ACAP em relação ao grupo controle ácido ($F= 2,7807$, $p= 0,00476$) e não teve diferença em relação ao grupo exposição 0.3mg/L Al ($F= 0,4083$, $p=0,6697$). No músculo, a ACAP não teve diferença entre os grupos experimentais ($F= 0,4083$, $p= 0,1101$). (Fig. 2A)

A exposição ao Al não alterou a atividade da Glutathione-S-transferase (GST) e não causou lipoperoxidação (LPO) nos peixes. Não teve diferença entre os grupos experimentais nos tecidos para GST (Brânquias: $F= 1,9558$, $p= 0,1792$; Fígado: $F= 1,0462$, $p= 0,4234$; Músculo: $F= 0,3193$, $p= 0,8113$) e LPO (Brânquias: $H= 3,3167$, $p= 0,3453$; Fígado: $F= 2,02172$, $p= 0,189492$; Músculo: $F= 1,8436$, $p= 0,209531$) (Fig. 2 B and C).



1

2 Figura 2. Biomarcadores de estresse oxidativo em *Bryconops caudomaculatus* em brânquias, fígado e músculo. (A) Capacidade antioxidante total; (B): Atividade da Glutathione-
 3 S-transferase; (C): Lipoperoxidação. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0.05$). Note
 4 a diferença das escalas dos gráficos.

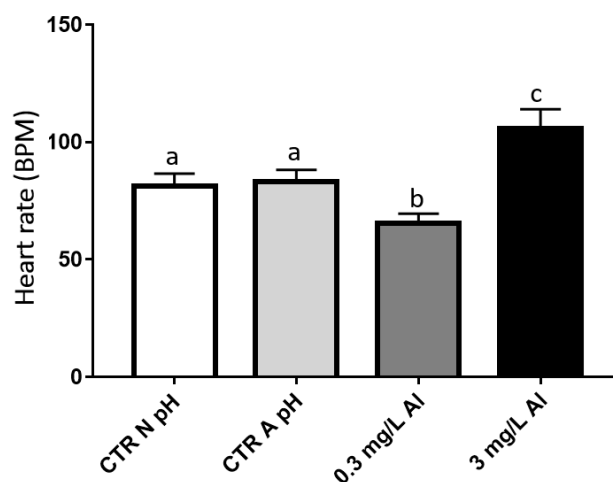
5 3.4 Eletrocardiograma em *B. caudomaculatus*

6 Os traçados do eletrocardiograma (ECG) dos peixes dos grupos controles neutro
7 e ácido foram claramente observados, conforme Cantanhêde et al. (2020). Os traçados
8 apresentaram ritmo sinusal sem alterações e com todos os parâmetros cardíacos: a onda
9 P, a onda T, o complexo QRS (despolarização ventricular), o intervalo RR (deflagração
10 positiva do ventrículo), o intervalo PQ (contração completa dos átrios) e o intervalo QT
11 (repolarização ventricular) (Fig. 3 A – D).

12 A frequência cardíaca dos peixes não teve diferença entre o grupo controle ácido
13 e o grupo controle neutro ($F= 47,76$, $p>0,05$). Os peixes expostos a menor concentração
14 de Al (0.3mg/L) apresentaram diminuição da frequência cardíaca no ritmo sinusal quando
15 comparados ao grupo controle ácido ($F= 47,76$, $p<0,0001$) (Fig. 4).

16 Os peixes expostos a maior concentração de Al (3 mg/mL) apresentaram aumento
17 da frequência cardíaca no ritmo sinusal em relação ao grupo controle ácido ($F= 47,76$,
18 $p<0,0001$). A frequência cardíaca dos peixes do grupo exposição 0.3mg/L Al foi menor
19 em relação ao grupo exposição 3 mg/mL Al ($F= 47,76$, $p<0,0001$) (Fig. 4).

20



21

22 Figura 4. Frequência cardíaca em batimentos por minuto de *Bryconops caudomaculatus*. Ctr N pH: Grupo
23 controle neutro; Ctr A pH: Grupo controle ácido. Valores expressos em média e erro padrão. Letras
24 diferentes representa diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0.05$).

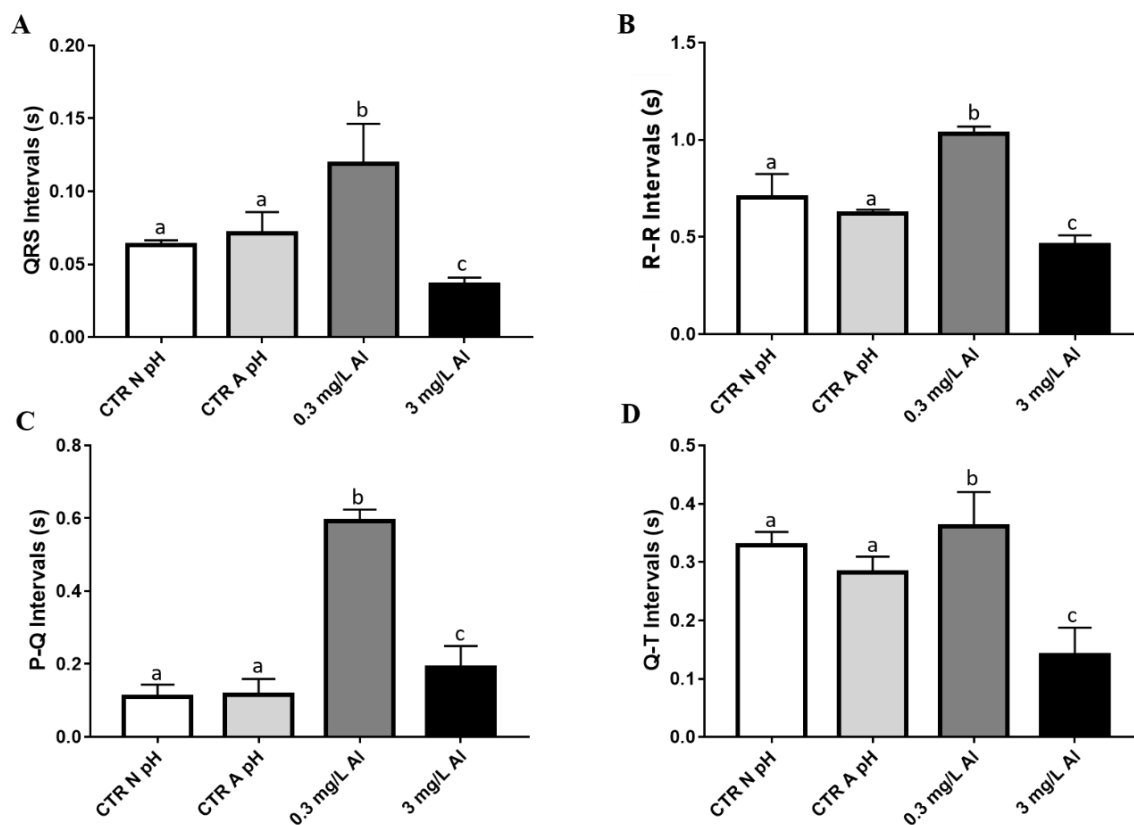
25

26 A duração do complexo QRS e de todos os intervalos (R-R, P-Q and Q-T) não
27 teve diferença entre o grupo controle ácido e o grupo controle neutro (QRS: $F= 28,96$,
28 $p>0,05$; RR: $F= 71,1$, $p>0,05$; PQ: $F= 167$, $p>0,05$; QT: $F= 32,96$, $p>0,05$). No ECG dos
29 peixes expostos a menor concentração de Al, todos os parâmetros cardíacos se
30 prolongaram (Fig. 5 A and B), sendo maiores em relação ao grupo controle ácido (QRS:

31 F= 28,96, $p < 0,0001$; RR: F= 71,1, $p < 0,0001$; PQ: F= 167, $p < 0,0001$; QT: F= 32,96,
 32 $p < 0,0001$) (Fig. 6). Os peixes desse grupo apresentaram prolongamento acentuado do
 33 intervalo PQ no ritmo sinusal (Fig. 5 B).

34 Nos peixes expostos a maior concentração de Al, os parâmetros cardíacos foram
 35 menores em relação ao grupo controle ácido (QRS: F= 28,96, $p < 0,0001$; RR: F= 71,1,
 36 $p < 0,0001$; PQ: F= 167, $p < 0,0001$; QT: F= 32,96, $p < 0,0001$) (Fig. 6). Os peixes desse
 37 grupo apresentaram ausência da onda P, mostrando bloqueio atrioventricular em 48h de
 38 exposição (Fig. 5 D). Todos os parâmetros cardíacos dos peixes do grupo exposição
 39 0.3mg/L Al foi maior em relação ao grupo exposição 3 mg/mL (QRS: F= 28,96,
 40 $p < 0,0001$; RR: F= 71,1, $p < 0,0001$; PQ: F= 167, $p < 0,0001$; QT: F= 32,96, $p < 0,0001$).

41



42

43 Figura 6. Parâmetros cardíacos do Eletrocardiograma de *Bryconops caudomaculatus*. A) Duração do
 44 complexo QRS (s); B) Duração do intervalo R-R (s); C) Duração do intervalo P-Q (s); D) Duração do
 45 intervalo Q-T (s). Ctr N pH: Grupo controle neutro; Ctr A pH: Grupo controle ácido. Valores expressos em
 46 média e erro padrão. Letras diferentes representa diferença estatística entre os grupos experimentais ($p <$
 47 $0,05$).

48

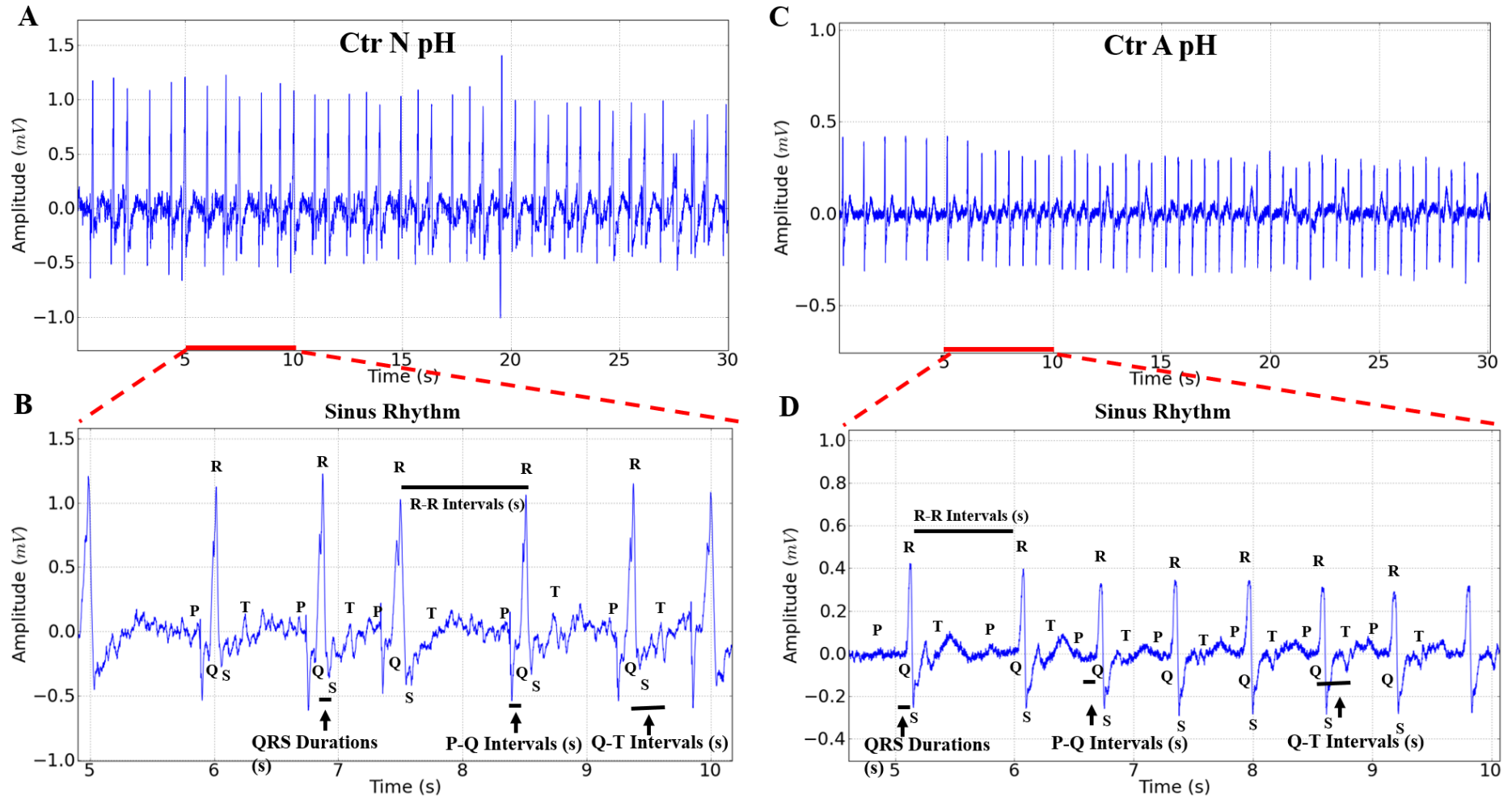


Figura 3. Eletrocardiograma (ECG) de *Bryconops caudomaculatus* dos grupos controles. ECG em 30 segundos de registro do grupo controle em pH neutro (A) e do grupo controle em pH ácido (C); Ritmo sinusal com os parâmetros cardíacos em amplificação de 5 segundos do grupo controle em pH neutro (B) e do grupo controle em pH ácido (D).

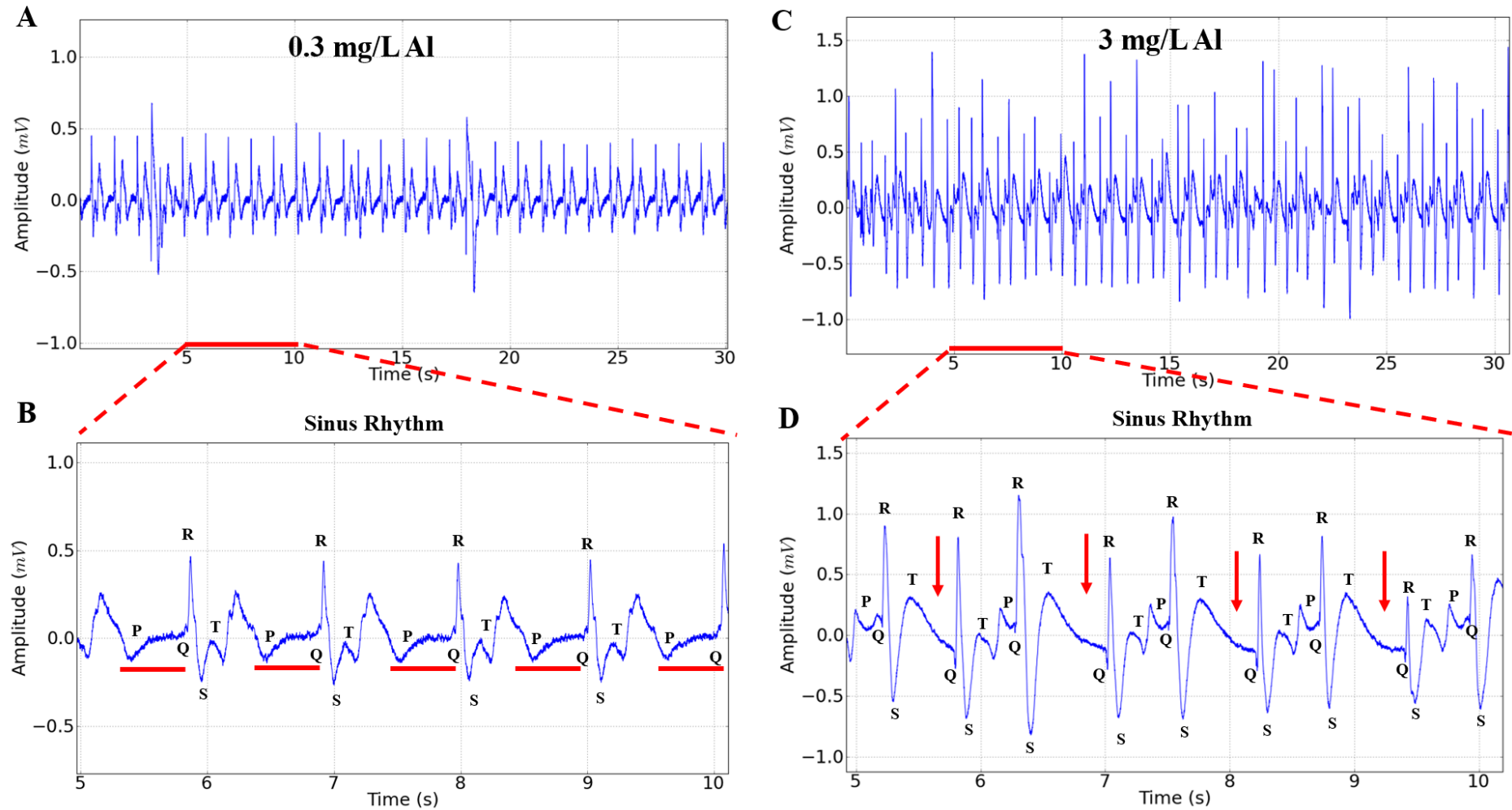


Figura 5. Eletrocardiograma (ECG) de *Bryconops caudomaculatus* dos grupos de exposição a Al. ECG em 30 segundos de registro do grupo exposição com 0.3mg/L de Al e do grupo exposição com 3 mg/L de Al (C); Ritmo sinusal com os parâmetros cardíacos em amplificação de 5 segundos do grupo exposição com 0.3mg/L de Al, mostrando na reta em vermelho o prolongamento do intervalo PQ (B) e do grupo exposição com 3 mg/L de Al, mostrando na seta em vermelho a ausência da onda P (D).

4 Discussão

Os complexos do Al hidrolisam facilmente em solução ácida (Gourier-Fréry and Fréry, 2004) geralmente em valores de pH em torno de 5 (Santore et al., 2018; Walton 2019). Os efeitos combinados de acidez e Al são influenciados por diversas outras características da qualidade da água, como a concentração de íons e outros ligantes, que formam complexos com o Al (Morel and Hering, 1993). Dos íons analisados, apenas os ligantes Sulfato e Fluoreto (não detectado nas amostras) influenciam na especiação do Al (Nordstrom and May, 1996). Os nossos resultados mostraram que as concentrações dos íons Cloreto foram constantes nos tempos experimentais. Sulfato foi maior no grupo de exposição com a maior concentração de Al nos tempos experimentais, esse resultado é esperado, visto que usamos o Sulfato de Alumínio como substância e mostra que o íon Sulfato se dissociou do Al no meio ácido.

O íon Nitrato foi maior no grupo controle ácido em relação ao grupo controle neutro nos tempos experimentais, mas não foi observado alterações nos parâmetros bioquímicos e cardíacos desses peixes. Comparando os grupos de exposição com o controle ácido, apenas no tempo 48h o Nitrato foi menor no grupo exposição com a maior concentração de Al. A concentração de Nitrato aumentou, devido a produção do íon através do metabolismo da amônia das excretas dos animais (Martinez et al., 2006). Então, este íon não interferiu na morfologia dos traçados eletrocardiográficos nem alterou os parâmetros bioquímicos dos peixes desses grupos, e sim o Alumínio. Pois, o Nitrato é considerado não tóxico para os animais aquáticos (Camargo and Alonso, 2006). E, em vertebrados, é usado em tratamento de doenças cardiovasculares (Lundberg et al., 2011) e tem efeitos protetores contra lesões no miocárdio (Jeddi et al., 2015). Além disso, apresenta propriedades antioxidantes nas células cardíacas (Khalifi et al., 2015).

Outro fator que pode interferir na solubilidade do Al é a qualidade da água quanto a sua dureza. Na caracterização prévia da água do meio experimental, as concentrações dos íons de Cálcio (Ca^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}) foram baixas, mostrando baixa dureza da água. Ou seja, em água mole, diminui a competição pelos sítios de absorção do Al com os íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} , aumentando a entrada do Al dissolvido nas células (Exley and Mold, 2015). Dessa forma, os parâmetros analisados da qualidade da água do meio experimental não interferiram nos resultados dos biomarcadores e nas respostas cardíacas de *B. caudomaculatus*.

Os dados de Al total demonstram a constância das concentrações deste elemento ao longo do experimento e que as diferenças esperadas para as concentrações nominais foram atingidas. A biodisponibilidade do Al aumenta em meio ácido, com alta potencialidade de absorção e imobilização do metal nos tecidos dos organismos (Walton, 2019). Nossos

resultados mostraram teores de Al no músculo de *B. caudomaculatus* em 48h de exposição, de forma concentração dependente. Os metais nos peixes são absorvidos pelas brânquias e se concentram em distintos tecidos (Rajkowska and Protasowicki, 2013). Neste estudo, o Al biodisponível foi absorvido pelas brânquias, gerando, alterações na sua resposta antioxidante. Verificou-se que mesmo em exposição aguda o metal foi distribuído para os outros tecidos dos peixes, inclusive acumulando de forma concentração-dependente no músculo. Observamos também alterações significativas no coração dos peixes em ambas as concentrações de Al, indicando que o Al absorvido pelas brânquias também foi direcionado através do sangue para o coração, interferindo na sua função.

Embora os peixes expostos a menor concentração tenham acumulado Al no músculo, as respostas antioxidantes desses peixes (ACAP e GST) não foram acionadas nesse tecido, assim como nas brânquias e no fígado. Esses peixes também não apresentaram peroxidação nos lipídios. Por ser uma concentração ambientalmente relevante de riachos amazônicos, os peixes residentes da Amazônia provavelmente possuem adaptações fisiológicas com níveis basais de enzimas antioxidantes que são eficientes para evitar os efeitos pro-oxidantes. Ressalta-se que, além da fisiologia dos peixes (Van der Oost et al., 2003), a ativação das respostas antioxidantes depende de outros fatores, como a concentração da substância química e a toxicocinética e toxicodinâmica da substância nos tecidos alvos (Silva and Ferrari, 2011). Os peixes expostos a maior concentração de Al, apresentaram um aumento da ACAP nas brânquias. Esses peixes também tiveram maior acúmulo de Al no músculo, indicando que a absorção e também a provável maior acumulação do Al nas brânquias interferiu nas respostas antioxidantes desses animais. A superfície das brânquias de peixe é revestida com muco que tem alta afinidade pela forma iônica Al^{3+} (Walton 2019). Então, a defesa antioxidante desse órgão aumentou nos peixes como uma forma de proteção efetiva contra a exposição aguda a maior concentração de Al. A alta eficiência da capacidade antioxidante das brânquias também pode ter prevenido a peroxidação lipídica e a ação da atividade da GST no órgão, bem como no fígado e no músculo desses peixes.

Nossos resultados corroboram o estudo de Abdalla et al. (2018), que expuseram o peixe Lambari-Tambuí *Astyanax altiparanae* a 1.0 mg/L e 4.85 mg/L de Al durante 96h e observaram aumento de defesas antioxidantes, como a Glutathione (GSH) e superóxido dismutase (SOD), nas brânquias a partir de 24h de exposição, associando os resultados com a prevenção dos danos oxidativos nas brânquias e no fígado dos peixes.

O fígado dos peixes expostos a maior concentração de Al também teve a sua Capacidade antioxidante acionada, com diminuição em relação aos peixes do grupo controle ácido. O

sistema antioxidante de um organismo também pode ser inibido sob a exposição a um estressor, dependendo da intensidade e a duração do estresse aplicado (Padmini and Usha Rani, 2009). Então, a menor ACAP no fígado desses peixes indica uma inibição do sistema antioxidante, causado pela exposição aguda às altas concentrações de Al.

Embora a exposição a ambas concentrações de Al em meio ácido não tenha gerado estresse oxidativo em 48h de exposição, o Al causou toxicidade cardíaca em *B. caudomaculatus*. A morfologia dos traçados eletrocardiográficos foi amplamente modificada nos peixes expostos ao Al. Os peixes expostos a menor concentração de Al, apresentaram aumento da duração dos parâmetros cardíacos analisados, o complexo QRS e os intervalos RR, PQ e QT, em consequência da diminuição da frequência cardíaca, caracterizando uma bradicardia. Nossos resultados corroboram com o estudo de Xing et al. (2017) que expuseram zebrafish (*Danio rerio*) ao Cádmio e após 48h de exposição observaram efeitos prolongados na duração dos intervalos PR, QRS, ST e QT mostrando cardiotoxicidade nas células cardíacas.

A alteração mais evidente nos peixes expostos a menor concentração de Al foi o aumento do intervalo PQ (aumento da distância da onda P para o início do complexo QRS), que indica uma alteração na automaticidade cardíaca dos peixes. O intervalo PQ representa a atividade de contração dos átrios e o início da atividade ventricular (Choi et al., 2010). O Al interferiu na capacidade do coração dos *B. caudomaculatus* de gerar os próprios potenciais de ação que levam a contração de suas fibras miocárdicas. Durante um potencial elétrico dos miócitos, os canais de Ca^{2+} se abrem após a entrada de Na^+ para a despolarização (Garduño-Juárez, 2012). Como o movimento do Al^{3+} para o interior da célula é restrito aos canais iônicos, o Al^{3+} compete com Ca^{2+} nos canais de transportes da membrana (Exley and Mold, 2015), entrando na célula e interferindo no automatismo das células cardíacas.

Outros metais também causaram alteração na automaticidade cardíaca de peixes. Por exemplo, o Mercúrio prejudicou potentemente em 96h de exposição aguda, a cinética do Ca^{2+} nos cardiomiócitos, a contratilidade do miocárdio e a condução elétrica pelo coração em duas espécies de peixes neotropicais, matrinxã (*Brycon amazonicus*) e traíra (*Hoplias malabaricus*) (Monteiro et al., 2017).

Os peixes expostos a maior concentração de Al apresentaram bloqueio atrioventricular em 48h de exposição, devido à ausência da onda P no ritmo sinusal. Essa alteração caracteriza parada cardíaca nos peixes. A onda P representa a excitação atrial (Harmer et al., 2011). Produtos químicos que afetam a atividade elétrica atrial podem alterar a amplitude da onda P, e mudança nessa amplitude indica a alteração potencial da despolarização atrial (Nada et al., 2013; Xing et al., 2017). A ausência da onda P diminui efetivamente a excitabilidade dos

miócitos, e isso ocorre devido a distúrbios dos canais iônicos (Xing et al., 2017). Os nossos resultados indicam que o Al agiu como um bloqueador dos canais iônicos nas células cardíacas de *B. caudomaculatus*, alterando intensamente a onda P, levando ao seu desaparecimento no ritmo sinusal.

É conhecido que as substâncias tóxicas podem produzir efeitos subletais sobre o coração, por meio do bloqueio dos canais de Na^+ , K^+ e Ca^+ (Garduño-Juárez, 2012). O bloqueio da corrente de Na^+ diminui a velocidade de condução da excitação dos miócitos, desencadeando arritmias e estar associada a um aumento da taxa de mortalidade (Harmer et al., 2011). Os peixes expostos a maior concentração de Al também apresentaram arritmia, devido ao aumento da frequência cardíaca em consequência da diminuição da duração dos intervalos dos parâmetros cardíacos. Ou seja, se a exposição dos peixes se prolongasse para além das 48h na concentração de 3mg/mL de Al, provavelmente ocorreria a morte dos animais.

É importante salientar que o potencial de cardiotoxicidade de um produto químico depende da absorção, distribuição e eliminação nos tecidos do peixe, e este processo varia consideravelmente em diferentes fases do ciclo de vida e tempo de exposição da espécie (Incardona and Scholz, 2016). O tempo de 48h de exposição foi o suficiente para causar cardiotoxicidade no coração de *B. caudomaculatus*, mostrando que o coração foi um tecido suscetível ao Al.

Em peixes, como em todos os outros vertebrados, o sistema cardiovascular é fundamental para o desempenho e sobrevivência, pois garante a distribuição e transporte eficaz de oxigênio e nutrientes para os tecidos (Gamperl and Driedzic, 2009). Nosso estudo mostrou que a exposição aguda a altas concentrações de Al afeta as funções cardíacas em peixes. Logo, sugerimos que a exposição prolongada ao Al em ambientes naturais com focos de poluição, pode causar problemas cardíacos graves e afetar diretamente a sobrevivência dos peixes, como a interferência na fuga contra predadores e busca de alimentos.

Dessa forma, concluímos que embora a exposição aguda ao Al não tenha gerado estresse oxidativo nos peixes, o Al foi altamente tóxico para as funções cardíacas de *B. caudomaculatus* em meio ácido, pois causou alterações significativas nos registros cardíacos em ambas as concentrações utilizadas. Os nossos resultados fornecem informações valiosas sobre a aplicação de espécies de peixes nativas amazônicas como biomonitoradores em estudos de avaliação toxicológica de produtos químicos. E ajudam no entendimento dos efeitos da combinação de Al e baixo pH sobre os peixes, principalmente em ecossistemas de água doce que possuem altas concentrações de Al em consequência do pH naturalmente baixo e das altas concentrações de Al no solo, como na bacia do rio Capim da Amazônia Oriental brasileira.

Referências

- Abdalla, RP, Kida, BMS, Pinheiro, JPS, Oliveira, LF, Martinez, CBF, Moreira, RG, 2019. Exposure to aluminum, aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 215, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.09.004>
- Amado, LL, Garcia, ML, Ramos, PB, Freitas, RF, Zafalon, B, Ribas Ferreira, JL, Yunes, JS, Monserrat, JM, 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total environmental*. 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington. American Public Health Association. 19th ed., 140 p.
- Angélica, RS, Kahn, H, Paz, SPA, 2018. A proposal for bauxite quality control using the combined Rietveld - Le Bail - Internal Standard PXRD method – Part 2: Application to a gibbsite bauxite from the Paragominas region, northern Brazil. *Minerals Engineering*. 122, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.03.039>
- Bainy, ACD, Saito, E, Carvalho, PSM, Junqueira, VBC, 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic toxicology*. 34, 151–162. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)
- Camargo, JA, Alonso, A, 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Cantanhêde, SM, Hamoy, M, Montag, LFA, Amado, LL, 2020. Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 228,108653. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>
- CETESB, 1978. Normalização Técnica NT-07. Análise físico-química das águas. São Paulo-SP, CETESB.

- Choi, S, Adnane, M, Lee, GJ, Jang, H, Jiang, Z, Park, HK, 2010. Development of ecg beat segmentation method by combining lowpass filter and irregular RR interval checkup strategy. *Expert Systems with Applications*. 37, 5208-5218. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2009.12.069>
- Clark, MW, Johnston, M, Reichelt-Brushett, AJ, 2015. Comparison of several different neutralisations to a bauxite refinery residue: Potential effectiveness environmental ameliorants. *Applied Geochemistry*. 56, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.015z>
- Costa-Pereira, R, Severo-Neto, F, 2012. Dining oiut: *Bryconops caudomaculatus* jumps out of water to catch flies. *Revista Chilena de História Natural*. 85, 241-244. (<https://www.redalyc.org/pdf/3699/369944301012.pdf>) (Access in: 01/08/2020).
- Driscoll, CT, Schecher, WD, 1990. The chemistry of aluminium in the environment. *Environmental Geochemistry and Health*. 12, 28–48. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>
- Driscoll, CT, Schecher, WD, 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environmental Geochemistry and Health*. 12, 28–49. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>
- Exley C, House, E, 2011. Aluminum in the Human Brain. *Monatshefte fur Chemie / Chemical Monthly*. 142, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0417-y>
- Exley, C, Mold, MJ, 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 30, 90e95. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.11.002>
- Gamperl, AK, Driedzic, WR, 2009. Cardiovascular function and cardiac metabolism, in: Richards, JG, Farrell, AP, Brauner, CJ (Eds.), *Fish Physiology: Hypoxia*, vol. 27. Academic Press, pp. 301–360.
- Garduño-Juárez, MA, 2012. Toxicidad por anestésicos locales. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 35, S78-S82. (<https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2012/cmas121c1.pdf>) (Access in: 01/08/2020).
- Gensemer, RW, Playle, RC, 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 29, 315-450. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>
- Goldberger, AL, 2012. *Clinical electrocardiography: a simplified approach*. Elsevier Health Sciences. 347, 17–39.

Gourier-Fréry, F, Fréry, N, 2004. Aluminum. *Toxicologie Pathologie*. 1, pp. 74 – 95. <https://doi.org/10.1016/j.emctp.2004.04.002>

Habig, WH, Jakoby, WB, 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*. 77, 398-405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)

Harmer, AR, Valentin, JP, Pollard, CE, 2011. On the relationship between block of the cardiac Na⁺ channel and drug-induced prolongation of the QRS complex. *British Journal of Pharmacology*. 164, 260-273. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01415.x>

Hermes-Lima, M, 2005. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, in: Storey, K. B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley- Liss, Hoboken, New Jersey, p. 319–368.

Igbokwe, IO, Igwenagu, E, Igbokwe, NA, 2019. Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary Toxicology*. 12, 45–70. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0007>

Incardona, JP, Scholz, NL, 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquatic Toxicology*. 177, 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.016>

Jeddi S, Zaman J, Ghasemi A, 2015. Effects of ischemic postconditioning on the hemodynamic parameters and heart nitric oxide levels of hypothyroid rats. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 104,136-43. <https://doi.org/10.5935/abc.20140181>

Khalifi S, Rahimipour A, Jeddi S, Ghanbari M, Kazerouni F, Ghasemi A, 2015. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. *Nitric Oxide*. 44, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.011>

Kotschoubey B, Calaf JMC, Lobato AC., Leite AS, Azevedo CHD, 2005. Caracterização e gênese dos depósitos de bauxita da Província Bauxitífera de Paragominas, noroeste da bacia do Grajaú, nordeste do Pará/ oeste do Maranhão, in: Marini OJ, Queiroz ET, Ramos BV (Eds.), *Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia*. Brasília, DNPMCT/ Mineral-ADIMB, p. 691-782.

Laitinen, M, Valtonen, T, 1995. Cardiovascular, ventilatory and haematological responses of brown trout (*Salmo trutta L.*) to the combined effects of acidity and aluminium in humic water at winter temperatures. *Aquatic Toxicology*. 31, 99–112. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00060-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00060-4)

Lottermoser, BG, 2010. Mine Wastes - Characterization, Treatment and Environmental Impacts, 3 ed. Springer, pp. 400.

Lundberg JO, Carlstrom M, Larsen FJ, Weitzberg E, 2011. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research*. 2011;89(3):525-32. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq325>

Lushchak, VI, 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

Martinez, CBR, Azevedo, FD, Winkaler, E, 2006. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais, in: Cyrino, JEP, Urbinati, EC. (Ed). *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. Jaboticabal - SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. pp: 81-95.

Mehjbeen, J, Irshad, A, Nazura, U, Masood, A, 2016. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. *Chemosphere*. 151, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.080>

Monteiro, DA, Taylor, EW, Rantin, FT, Kalinin, AL, 2017. Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 201, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.09.004>

Morel, FMM, Hering, JG, 1993. *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York.

Nada, A, Gintant, GA, Kleiman, R, Gutstein, DE, Gottfridsson, C, Michelson, EL, Strnadova, C, Killeen, M, Geiger, MJ, Fiszman, ML, Koplowitz, LP, Carlson, GF, Rodriguez, I, Sager, P, 2013. The evaluation and management of drug effects on cardiac conduction (PR and QRS intervals) in clinical development. *American Heart Journal*. 165, 489–500. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2013.01.011>

Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and Disease. *Environmental Research Section A*. 89, 101-115. <https://doi.org/0.1006/enrs.2002.4352>

Nordstrom, DK, May, HM, 1996. Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species, in: Sposito G (Ed.), *The Environmental Chemistry of Aluminum*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 29-55.

Oakes, KD, Van Der Kraak, G. J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*. 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00204-7)

Oliveira, VM, Assis, CRD, Costa, HMS, Silva, RPF, Santos, JF, Carvalho Jr, LB, Bezerra, RS, 2017. Aluminium sulfate exposure: A set of effects on hydrolases from brain, muscle and digestive tract of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 191, 101–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.002>

Pascoaloto, D. Hidroquímica dos rios da Amazônia., 2006. Centro Cultural dos Povos da Amazônia – CCPA, Manaus-AM.

Rajkowska, M, Protasowicki, M, 2013. Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophy in Northwestern Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185, 3493–3502. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2805>

Ribeiro, MC, Moron, SE, Lopes, JM, 2017. Histological Analysis of *Bryconops Caudomaculatus* Gills and Liver under different concentrations of ammonia. *Boletim do Instituto de Pesca*. 43, 35-43. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p35>

Salinas, AE; Wong, MG, 1999. Glutathione S-transferases: a review. *Current Medicinal Chemistry*. 6, 279– 309.

Santore, RC, Ryan, AC, Kroglund, F, Teien, HC, Rodriguez, PH, Stubblefield, WA, Cardwell, AS, Adams, WJ, Nordheim, E, 2018. Development and application of a biotic ligand model for predicting the toxicity of dissolved and precipitated aluminum. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37,70-79. <https://doi.org/10.1002/etc.4020>

Schafer, U, Jahreis, G, 2009. Update on regulations of aluminium intake - biochemical and toxicological assessment. *Trace elements and electrolytes*, 26, 05-99. <https://doi.org/10.5414/TEP26095>

Sheehan, D, Meade, G, Foley, VM, Dowd, CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. 360, 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>

Silva, CC, Ferreira, EJG, Deus, CP, 2008. Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon grainage, Brazil). *Neotropical Ichthyology*. 6, 237–242. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200011>

Silva, WJM, Ferrari, CKB, 2011. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. 14, 441-451. <https://doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>

Song, J, Qiao, L, Ji, L, Ren, B, Hu, Y, Zhao, R, Ren, Z, 2018. Toxic responses of zebrafish (*Danio rerio*) to thallium and deltamethrin characterized in the electrocardiogram. *Chemosphere*. 212, 1085-1094. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.014>

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2007. Method 3051A – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf (Access in: 01/03/2020)

Van der Oost, R, Beyer, J, Vermeulen, NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*. 13, 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Walton, JR, 2019. Bioavailable Aluminum: Its Metabolism and effects on the environment encyclopedia of environmental health. Second ed. pp. 328-339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11224-2>

Welz, B, Sperling, M, 1999. Atomic Absorption Spectrometry, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim, New York.

Xing, N, Ji, L, Song, J, Jingchun, M, Li, S, Ren, Z, Xu, F, Zhu, J, 2017. Cadmium stress assessment based on the electrocardiogram characteristics of zebra fish (*Danio rerio*): QRS complex could play an important role. *Aquatic Toxicology* 191, 236–244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.015>

Zamek-Gliszczyński, MJ, Hoffmaster, KA, Nezasa, KI, Tallman, MN, Brouwer, KLR, 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27, 447-486. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007>

Zar, JH, 1999. Biostatistical analysis. 4th Ed. Northern Illinois University, Prentice Hall.

CONCLUSÕES GERAIS

Em geral, conclui-se que o uso de biomarcadores de poluição aquática na espécie de peixe residente amazônico *Bryconops caudomaculatus* possibilitou uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos do Al em áreas onde esse metal é encontrado naturalmente, e que atividades antrópicas interferem nessas respostas. Nossos dados fornecem informações valiosas sobre a aplicação de espécies de peixes nativas amazônicas como biomonitores em estudos de avaliação toxicológica de produtos químicos. *B. caudomaculatus* se mostrou como excelente biomonitor, e sugerimos o seu uso para fins de teste de toxicidade.

Os resultados gerados nesse estudo poderão subsidiar programas de recuperação e gestão ambiental em áreas de mineração da Amazônia, por meio das ferramentas utilizadas. Além disso, o uso dos biomarcadores utilizados pode servir como medida preventiva para evitar danos maiores em níveis superiores de organização ecológica.

A partir dos resultados aqui gerados, nos induz a refletir sobre a resolução brasileira, que estabelece valores máximos de Al para espécies que foram padronizadas em estudos de toxicidade. Considerando as particularidades da região Amazônica, que possui naturalmente altas concentrações de Al, nossos dados mostram que é necessário rever a resolução. O limiar de toxicidade do Al para as espécies nativas parece ser bem pequeno, pois em ambientes naturais, a manutenção de altos valores de Al dissolvido em pontos que sofrem influência de mineração já foi o suficiente para gerar uma resposta de estresse oxidativo em *B. caudomaculatus*.

ANEXO 1

Normas para estrutura do artigo da revista Science of the Total Environment (Capítulo 1)

Limite de páginas do manuscrito: não há restrição quanto ao número de páginas, mas a brevidade dos artigos é altamente recomendada.

Subdivisão - seções numeradas: divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas.

Introdução: indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando o levantamento detalhado da literatura ou a síntese dos resultados.

Material e métodos: forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência.

Resultados: devem ser claros e concisos.

Discussão: deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões: as principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de título:

- Título: Conciso e informativo. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- Nomes e afiliações dos autores: Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- Autor para correspondência: Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de avaliação e publicação, também após a publicação.

Destaques: são obrigatórios, inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por marcador).

Resumo: deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. As referências devem ser evitadas. Limite seu resumo a 300 palavras.

Resumo gráfico: é obrigatório para esta revista e devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com no mínimo 531×1328 pixels (h \times w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5×13 cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivo preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office.

Palavras-chave: máximo 6 palavras-chave e não devem conter nenhuma palavra já no título.

Agradecimentos: em uma seção separada no final do artigo antes das referências.

Formatação de fontes de financiamento: liste as fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Formatação de referência: não há requisitos rígidos sobre a formatação de referência no momento do envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. O uso do DOI é altamente encorajado

Citações no texto: Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação; Dois autores: nome de ambos os autores e ano de publicação; Três ou mais autores: o nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação.

ANEXO 2

Normas para estrutura do artigo da revista *Aquatic Toxicology* (Capítulo 3)

Subdivisão: divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas.

Introdução: indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando o levantamento detalhado da literatura ou a síntese dos resultados.

Material e métodos: forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência.

Resultados: os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão: deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões: as principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de título:

- Título: Conciso e informativo. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- Nomes e afiliações dos autores: Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- Autor para correspondência: Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de avaliação e publicação, também após a publicação.

Destaques: são opcionais, mas altamente encorajados para este periódico. Inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por marcador).

Resumo: Um resumo conciso e factual é exigido de no máximo 300 palavras.

Palavras-chave: Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave.

Agradecimentos: Reúna os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências.

Formatação de fontes de financiamento: Liste as fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador.

Legendas das figuras: Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. A legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados.

Tabelas: Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em página (s) separada (s) no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja cauteloso no uso de tabelas e assegure-se de que os dados nelas apresentados não dupliquem os resultados descritos em outra parte do artigo. Evite usar réguas verticais e sombreamento nas células da tabela.

Formatação de referência: não há requisitos rígidos sobre a formatação de referência no momento do envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. O uso do DOI é altamente encorajado

Citações no texto: Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação; Dois autores: nome de ambos os autores e ano de publicação; Três ou mais autores: o nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação.