

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DANIELE SALGUEIRO DE MELO

EFEITO TOXICOLÓGICO DA ETERAMINA EM JUVENIS DE TILÁPIA
NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)

Belo Horizonte

2019

Daniele Salgueiro de Melo

EFEITO TOXICOLÓGICO DA ETERAMINA EM JUVENIS DE TILÁPIA
NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Zootecnia
Área de concentração: Produção Animal
Orientador: Prof. Kleber Campos Miranda Filho
Co-orientadora: Prof. Lilian Viana Teixeira
Banca examinadora: Prof. Daniela Chemim de Melo
Hoyos e Prof. Luciano dos Santos Rodrigues.

Belo Horizonte

2019

M528e Melo, Daniele Salgueiro de, 1993-
Efeito Toxicológico da Eteramina em Juvenis de Tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) / Daniele Salgueiro de Melo, - 2019.

71 f.:il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho
Coorientadora: Lilian Viana Teixeira
Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Produção Animal.

Bibliografia: f.: 30 a 36; f.: 64 a 71

1. Tilápia - Peixe - Teses – 2. Doença - Teses - 3. Produção Animal - Teses -
I. Filho, Kleber Campos Miranda – II. Teixeira, Lilian Viana – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Efeito toxicológico da eteramina em juvenis de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Daniele Salgueiro de Melo

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia treze de fevereiro de dois mil e dezenove, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

Luciano dos Santos Rodrigues
Universidade Federal de Minas Gerais

Daniela Chemim de Melo Hoyos
Universidade Federal de Minas Gerais

Kleber Campos Miranda Filho
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte,
13/02/2019

DEDICATÓRIA

À minha família, principalmente a meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram nos estudos. Ao meu namorado, Henrique, pelo apoio em cada etapa de nossas vidas e pela felicidade que nosso relacionamento me proporciona.

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida e saúde, por estar sempre comigo e por me dar forças para alcançar meus objetivos. Quero expressar meus sinceros agradecimentos e profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho:

À minha família, a quem tanto devo. Em especial, meus pais, Sandra e Dino, pelos ensinamentos, incentivos e apoio financeiro; meus irmãos, Luiz e Rodrigo, e minhas cunhadas, Isa e Júlia, pelos incentivos, companhia e cumplicidade; meus primos, João e Ana, por toda ajuda e apoio emocional; minha tia, Nuna, por toda paciência, incentivo e apoio desprendido nesses 7 anos de UFMG. Gratidão a toda minha família pelo suporte e amor compartilhados.

À minha segunda família, família do namorado, a quem também tanto devo. Em especial, meus sogros queridos, Lindinéia e Osman, e meu cunhado, Bruno, pela amizade e pela força sempre. Ao namorado e amigo, Henrique, pelo apoio em cada etapa de nossas vidas e pela presença constante e fundamental nos momentos de felicidade e também nas horas de incerteza.

À minha psicóloga, por existir.

Ao Professor Kleber Campos Miranda Filho, por sua orientação e sabedoria, ajudando no meu crescimento pessoal e intelectual durante o tempo convívio.

À Professora Lilian Viana Teixeira, por sua co-orientação, disponibilidade, colaboração no desenvolvimento deste trabalho, e também pela amizade construída durante toda minha vida acadêmica.

Aos amigos do LAQUA, em especial, Dani, Tai, Leo, João, Márcio, Aninha e Vitor, da Maricultura, meu muito obrigada pela paciência, companheirismo e por toda ajuda na execução do experimento; e Camila, Luanna, Uai, Rafa, Cris, Nayara, Laura e Marina, pelo companheirismo e amizade construída neste período.

Aos amigos da vida, Brunas (Barçante e Faustino), Rogéria, Sarah, Matheus e Vini, que se fizeram presente me apoiando em todas as etapas dessa caminhada. Obrigada por existirem!

Ao grupo de estudos da GEPPesc/UFMG pelos momentos de reflexão e incentivo.

À Érika, Gabriel, Suellen, Marco Antônio, Valéria e a Leimar, pelo convívio agradável nos laboratórios e apoio técnico durante a execução deste trabalho.

À banca examinadora, por aceitarem participar da minha avaliação.

Ao Departamento de Zootecnia da EV/UFMG, por disponibilizar toda infraestrutura necessária à execução destas atividades.

À UFMG pela disponibilidade de recursos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pela bolsa de mestrado e também de IC, mestrado e doutorado dos outros alunos envolvidos.

EPÍGRAFE

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

RESUMO

O Brasil sentiu, recentemente, as consequências da falta de observância e de medidas preventivas no setor minerário. O rompimento de barragens de rejeito é um risco inerente à indústria de mineração devido à dinâmica econômica do setor. Apesar disto, a atenção dada a essa problemática não tem sido suficiente, visto os repetidos eventos de rompimento de barragens no Brasil e no mundo. A eteramina é um coletor utilizado no setor minerário brasileiro, que após seu uso, é destinada às barragens de rejeito. Não são facilmente biodegradáveis e são tóxicas para organismos aquáticos. O processo de biodegradação e os produtos formados, não estão completamente compreendidos, sendo que as incertezas quanto à presença de eteramina e sobre os efeitos causados por elas, quando da ocorrência de vazamentos e/ou rompimento das barragens de rejeitos, merecem maior atenção e monitoramento. Sendo a eteramina um coletor aniônico largamente utilizado no setor minerário brasileiro, e a escassez de estudos sobre seus impactos no ecossistema aquático; o presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis alterações provocadas pela exposição aguda ao composto por meio de parâmetros bioquímicos, glutatona reduzida (GSH); hematológicos, hemoglobina (Hb) e metahemoglobina (MetHb); fisiológicos, frequência ventilatória (FV); e alterações histopatológicas nas tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas. Juvenis de tilápia ($3,1 \pm 0,3$ cm, $0,6 \pm 0,1$ g) foram expostos a diferentes concentrações de eteramina da água: 0 (controle); 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg/L, por 96 h. Em cada tratamento duplicado, sete peixes foram mantidos em béqueres de 2 L por 96 h, em temperatura aproximada de 28°C, fotoperíodo de 12 h e pH aproximadamente de 7,4. Para a estimativa das concentrações letais medianas (CL_{50-96 h}) foi utilizado o programa “Trimmed Spearman Karber method.” A concentração letal mediana (CL_{50-96 h}) foi de 2,34 mg/L com um nível de segurança de 0,23 mg/L de eteramina, específico para esta espécie. O composto agiu como agente estressor, reduzindo as concentrações de Hb e de GSH, e induzindo a formação de MetHb, e o aumento da FV em tilápias. O estudo histopatológico mostrou os principais efeitos causados nas brânquias e fígado, corroborando no que diz respeito aos cuidados que devem ser tomados com poluentes no ambiente aquático. As principais alterações encontradas nas brânquias foram hiperplasia, hipertrofia, hiperemia, fusão lamelar, desprendimento do epitélio respiratório, aneurismas, entre outros. Sendo que se intensificaram com a exposição às crescentes concentrações de eteramina na água.

Palavras chave: Ecotoxicologia, concentração letal mediana, CL₅₀, mineração.

ABSTRACT

Brazil has recently felt the consequences of the lack of compliance and preventive measures in the mining sector. The failure of tailings dams is an inherent risk in the mining industry due to the economic dynamics of the sector. Despite this, the attention given to this problem has not been enough, given the repeated events of dam failure in Brazil and in the world. Etheramine is a collector used in the Brazilian mining sector, which, after its use, is destined for tailings dams. They are not readily biodegradable and are toxic to aquatic organisms. The biodegradation process and the products formed are not completely understood, and the uncertainties regarding the presence of etheramine and the effects caused by them, when leakage and/or rupture of tailings dams occur, deserve greater attention and monitoring. Since etheramine is an anionic collector widely used in the Brazilian mining sector, and the scarcity of studies on its impacts on the aquatic ecosystem; the present work had as objective to evaluate the possible alterations provoked by the acute exposition to the compound. through biochemical parameters, reduced glutathione (GSH); hematological, hemoglobin (Hb) and methemoglobin (MetHb); physiological, ventilatory frequency (VF); and histopathological changes in exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Juvenile tilapia (3.1 ± 0.3 cm, 0.6 ± 0.1 g) were exposed to different concentrations of etheramine in the water: 0 (control); 0.4; 0.8; 1.6; 3.2 and 6.4 mg/L, for 96 h. In each duplicated treatment, seven fish were kept in 2 L beakers for 96 h, at a temperature of approximately 28°C, photoperiod of 12 h and a pH of approximately 7.4. To estimate the median lethal concentrations (CL_{50-96 h}) the “Trimmed Spearman Karber method” program was used. The median lethal concentration (LC_{50-96 h}) was 2.34 mg/L with a safety level of 0.23 mg/L of etheramine, specific for this species. The compound acted as a stressor, reducing the concentrations of Hb and GSH, and inducing the formation of MetHb, and the increase of FV in tilapia. The histopathological study showed the main effects caused in the gills and liver, corroborating with regard to the care that must be taken with pollutants in the aquatic environment. The main alterations found in the gills were hyperplasia, hypertrophy, hyperemia, lamellar fusion, detachment of the respiratory epithelium, aneurysms, among others. They intensified with exposure to increasing concentrations of etheramine in water.

Keywords: Ecotoxicology, median lethal concentration, LC₅₀, mining.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de formação do composto.....	21
Figura 2. Fases do metabolismo sobre os xenobióticos.....	29
ARTIGO - Efeito toxicológico da eteramina em juvenis de tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação BOD (SL-224)	45
Figura 2. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração).....	47
Figura 3. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de tilápias (<i>O. niloticus</i>) expostas a níveis crescentes de eteramina.....	49
Figura 4. Valores médios e desvio padrão de frequência ventilatória (Bo/min) de tilápias (<i>O. niloticus</i>) expostas a níveis crescentes de eteramina.....	51
Figura 5. Valores médios e desvio padrão de hemoglobina (g/L) de tilápias (<i>O. niloticus</i>) expostas a níveis crescentes de eteramina	53
Figura 6. Valores médios e desvio padrão de metahemoglobina (%) de tilápias (<i>O. niloticus</i>) expostas a níveis crescentes de eteramina	54
Figura 7. Valores médios e desvio padrão de GSH (mmol/mL) de tilápias (<i>O. niloticus</i>) expostas a níveis crescentes de eteramina	56
Figura 8. Fotomicrografias mostrando tecido branquial de juvenis de tilápia <i>O. niloticus</i> expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A - grupo controle, epitélio de revestimento (ER), lamela primária (LP), lamela secundária (LS) e hemácias (HE) (400x); B – 0,4 mg/L de eteramina, hiperplasia epitelial (estrela) e congestão (seta) (400x); C – 0,8 mg/L de eteramina, desprendimento epitelial (seta) e hiperplasia epitelial (estrela) (400x); D – 1,2 mg/L de eteramina, fusão lamelar (estrela) e aneurisma (seta) (200x); E – 3,2 mg/L de eteramina, necrose (setas) (400x); F – 6,4 mg/L de eteramina, desprendimento epitelial (setas) e alteração estrutural (estrelas) (400x). Coloração HE	59
Figura 9. Fotomicrografias mostrando o parênquima hepático de juvenis de tilápia <i>O. niloticus</i> expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A - grupo controle, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (cabeças das setas), hemácias (flechas), células de Kupffer (setas), sinusóides (estrelas) e veia central (vc) (200x); B – 0,4 mg/L de eteramina, vacúolos citoplasmáticos e degeneração nuclear (estrelas) e congestão (setas) (400x); C – 0,8 mg/L de eteramina, hepatócitos com vacuolização difusa no citoplasma e degeneração nuclear (setas) (100x); D – 1,2 mg/L e E – 3,2 mg/L de eteramina, vacuolização difusa do parênquima hepático (setas) (200x); F – 6,4 mg/L de eteramina, vacuolização difusa do parênquima hepático (setas), necrose (estrelas) e congestão (cabeças das setas) (200x). Coloração HE.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores máximos de compostos nitrogenados para padrões de lançamento de efluentes e qualidade da água para consumo humano na legislação Brasileira.....	23
Tabela 2. Limite máximo de concentração de nitrosaminas presentes em águas e organismos aquáticos	24
ARTIGO - Efeito toxicológico da eteramina em juvenis de tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) a diferentes concentrações de eteramina.	48
Tabela 2. Valores estimados das CL ₅₀ (concentrações letais medianas) da eteramina sobre juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>). Valores somados aos respectivos intervalos de confiança (IC) e o nível de segurança (NS) em 96 h	49
Tabela 3. Valores das CL ₅₀ (concentrações letais medianas) de amônia e nitrito para diferentes espécies de peixes.	50
Tabela 4. Índices de órgão (I _{org}) branquial e hepático estimados da exposição à eteramina de juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>).....	577

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - catalase
CL₅₀ - Concentração Letal Mediana
d.p. - desvio padrão
ERO - espécie reativa de oxigênio
etc - e outras coisas
GPx - glutationala-peroxidase
GR - glutationala-redutase
GSH - glutationala reduzida
GSSG - glutationala dissulfeto
GST - glutationala-S-transferase
Hb - hemoglobina
HE - hematoxilina/eosina
I_{org} - índice do órgão
Ltda. - limitada
MeHb - metahemoglobina
OD - oxigênio dissolvido
OH - hidroxila ou oxidrila
P.A. - reagente com qualidade para análise
pH - potencial hidrogeniônico
S.A - sociedade anônima
SOD - superóxido-dismutase

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AQUABIO - Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática

CEUA - Comissão de ética no uso de animal

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração

IEF - Instituto Estadual de Florestas

IPCA - Índice Nacional de Preços ao Consumidor Amplo

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

LAQUA - Laboratório de Aquicultura

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS - Organização Mundial de Saúde

SEDRO - Secretaria de Estado de Desenvolvimento Regional, Política Urbana e Gestão Metropolitana.

SisRGP - Sistema Informatizado do Registro Geral de Pesca

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

Fe²⁺ - ferro no estado ferroso

Fe³⁺ - ferro no estado férrico

g - grama

g/L - grama por litro

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

km - quilômetro

L - litro

m³ - metros cúbicos

mg - miligrama

mg/L - miligrama por litro

mL – mililitro

mmol – milimol

N-AT - nitrogênio na forma de amônia total

NH₃ - amônia não ionizada ou amônia gasosa

NH₄⁺ - cátion monovalente amônia ionizada ou íon amônio

N-NH₃ - nitrogênio na forma de amônia não ionizada

N-NO₂⁻ - nitrogênio na forma de nitrito

NO₂⁻ - ânion monovalente do elemento químico nitrito

US\$ - Dólar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Mineração	17
2.2. Beneficiamento do minério de ferro	20
2.3. Toxicologia das eteraminas.....	21
2.4. Impacto sobre a ictiofauna do desastre ambiental da Samarco.....	24
2.5. Aquicultura e pesca no rio Doce	25
2.6. Testes de toxicidade	26
2.7. Biomarcadores	28
2.8. O organismo teste – Tilápia	32
3. REFERÊNCIAS.....	33
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. Objetivo geral	40
4.2. Objetivos específicos	40
ARTIGO	41
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Instalações e condições experimentais	44
2.2. Análises físico-químicas da água.....	46
2.3. Frequência ventilatória	46
2.4. Estudo hematológico.....	46
2.5. Estudo histológico.....	46
2.6. Análise estatística e tratamento dos dados.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. Sobrevivência e CL ₅₀	48
3.2. Frequência ventilatória	51
3.3. Biomarcadores hematológicos	52
3.4. Biomarcador bioquímico	55
3.5. Biomarcadores morfológicos	57
4. CONCLUSÃO.....	66
AGRADECIMENTOS	66
REFERÊNCIAS	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a contaminação dos recursos hídricos pode ser apontada como uma das consequências da busca contínua pelo desenvolvimento econômico mundial. Entre as possíveis fontes de contaminação dos recursos hídricos, encontram-se os efluentes de processos industriais que se não forem tratados e destinados adequadamente podem acarretar sérios prejuízos ao ambiente.

A poluição química, seja de natureza orgânica ou inorgânica, decorrente da indústria, pode afetar seriamente o meio ambiente (Aguiar et al., 2002). A mineração é uma atividade industrial consumidora de grandes quantidades de água na etapa de beneficiamento, onde se separa o rejeito do minério. Devido à necessidade de aumentar a eficiência do processo de beneficiamento, vê-se uma intensificação do emprego de produtos químicos como depressores, dispersantes, floculantes, coletores, espumantes, dentre outros (Silva, 2009). Esses químicos utilizados ficam contidos no rejeito do processo que é destinado às barragens de contenção, podendo ser uma forma de contaminação dos recursos hídricos.

Um exemplo da extensão poluidora deste setor foi vivenciado recentemente no país, com repercussão mundial, por ser considerado o maior desastre ambiental da história do Brasil. Em novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos de Fundão da Samarco Mineração S.A., causando a destruição do subdistrito de Bento Rodrigues, em Mariana, na Região Central de Minas Gerais, Brasil. Além da elevada quantidade de material sólido particulado, também estava presente a eteramina, coletor usado no processo de beneficiamento do minério de ferro, que tem potencial de interferir na comunidade aquática devido à sua toxicidade.

No entanto, pouco se sabe sobre a ação da eteramina em sistemas biológicos, e, além disso, a sensibilidade a contaminantes existente no meio aquático é diferente para cada espécie e para cada fase de desenvolvimento do animal (Ribeiro et al., 2009), sendo necessário estudos toxicológicos com diferentes espécies. Porém, o ônus gerado com estudos para todas as espécies existentes é inviável, sendo necessária a escolha de organismos testes como representantes para inferir o comportamento metabólico como um todo. De acordo com o que fora destacado, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito causado pela exposição à eteramina sobre a sobrevivência, frequência ventilatória (FV) e parâmetros sanguíneos, tais como: hemoglobina (Hb), metahemoglobina (MetHb) e glutatona (GSH), em juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), bem como possíveis alterações teciduais nas brânquias e no fígado dos animais expostos, buscando compreender a ação desse composto.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.Mineração

A mineração Brasileira remete à época colonial, com a busca e o aproveitamento de seus recursos naturais. Segundo o IBRAM (2015), o Brasil é detentor de uma diversidade geológica propícia à existência de jazidas de vários minerais, conquistando posição de destaque no cenário global, tanto em reservas quanto em produção mineral.

A atividade envolve setores destinados a pesquisar, mensurar, extrair, beneficiar e transformar recursos minerais, tornando-os proveitos econômicos e sociais (IBRAM, 2016). Esse setor industrial foi construído sob uma visão estratégica de desenvolvimento nacional, tendo por base uma política e uma legislação fomentadoras (Barreto, 2001), sendo atividade indispensável para a manutenção do padrão de vida e avanços tecnológicos do mundo moderno.

O Brasil é destaque no setor minerador, movimentando US\$ 28,3 bilhões em exportações em 2017, um aumento de 31,2% em relação ao ano anterior, com saldo mineral aumentado em 27% em relação à 2016 (IBRAM, 2018c). Nesse contexto, o minério de ferro está inserido entre um dos mais importantes bens primários para a indústria de transformação no país (Colling e Rizzo, 2017), representando uma parcela de 68% do total de produtos minerais exportados em 2017 (IBRAM, 2018a).

O país é o segundo maior exportador de minério de ferro do mundo (Colling e Rizzo, 2017), sendo extraído, principalmente, nos Estados de Minas Gerais e Pará (BRASIL, 2017). O setor mineral de Minas Gerais contribuiu com 63,83% do saldo comercial de todo o Estado, sendo o ferro o principal produto de origem mineral exportado, representando 71% em 2017 (IBRAM, 2018b).

Segundo IBRAM (2015), as principais empresas produtoras de minério de ferro no Brasil em 2014 foram: Vale S.A. (79,92%), Companhia Siderúrgica Nacional/Namisa (8,26%) e Gerdau (1,9%). A Samarco Mineração S.A., *joint-venture* da BHP Billiton Brasil Ltda. e Vale S.A, também se consolidou entre as mais importantes empresas do mercado de minério de ferro, com operações em Minas Gerais e Espírito Santo (Samarco, 2014).

No entanto, apesar de imprescindível, grandes responsabilidades seguem adjacentes à atividade de mineração devido ao seu potencial impacto poluidor. É importante destacar que:

As preocupações com a preservação do meio ambiente aparecem nos anos 80, embora algumas empresas tenham começado a incorporá-las já na década de 1970. Nesse sentido, tem-se uma evolução do equacionamento da dimensão ambiental no

Brasil, que se refletiu no setor mineral e que se pode identificar em três grandes fases: a primeira até os anos 60, caracterizada por uma visão fragmentada, quando a proteção ambiental incidia apenas em alguns recursos, particularmente aqueles relacionados mais estreitamente à saúde humana, como o controle da água potável, a preocupação por algumas espécies da flora e fauna e pelas condições no ambiente de trabalho; a segunda, dos anos 70 a 80, inicia-se com o enfrentamento de questões mais amplas, como a poluição ambiental e o crescimento das cidades, culminando com a visão holística do meio ambiente como um ecossistema global; e a terceira, a partir dos anos 90, que posiciona o paradigma do desenvolvimento sustentável como o grande desafio, ou seja, como equacionar desenvolvimento econômico e social com preservação do ecossistema planetário (Barreto, 2001, p.6).

Um dilema social do mundo moderno seria a aplicação de ações que reduzam os resíduos gerados diariamente, mantendo-se os mesmos padrões de vida. O mesmo dilema pressiona o setor minerário, onde a eficiência no uso dos recursos e o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de resíduos são estratégicos (IBRAM, 2016).

A importância do presente estudo reside no fato de que o olhar para natureza como mera condição de produção pelo setor minerário não está mais sendo admissível. E esta perspectiva se torna evidente quando noticiado diversos casos de negligência que causaram desastres ambientais do setor ao longo dos anos.

O rompimento de barragens de rejeito é um risco inerente à indústria de mineração devido à dinâmica econômica do setor mineral (Mansur et al., 2016). Apesar disto, a atenção dada a essa problemática não tem sido suficiente, visto os repetidos eventos de rompimento de barragens de mineração no Brasil e no mundo.

Bowker e Chambers (2015) ao analisar os rompimentos de barragens ocorridos entre 1910 e 2010, notaram o aumento da ocorrência de rompimentos, identificando mais de 30 rompimentos após o ano de 1990 no mundo. Os autores acreditam que isso seja reflexo da modernização do setor minerário, sendo que tecnologias foram aplicadas para extração de minérios em concentrações cada vez menores, aumentando a quantidade de rejeitos da atividade.

No contexto Brasileiro, somente nos últimos 13 anos, a mesma empresa (Samarco S.A.) esteve envolvida em três desastres ambientais causados pela atividade de mineração. Segundo Mansur et al. (2016), em 2006, em Barra Longa (MG); em 2008, em Anchieta (ES); e em 2010, em Espera Feliz (MG), o vazamento da polpa de minério contaminou cursos d'água, comprometendo, em especial, o abastecimento para o consumo humano. Além disto, os autores afirmam que a mineradora acumulava 19 infrações ambientais desde 1996 até o momento do rompimento da barragem de Fundão (2015), maior desastre ambiental da história

do Brasil, até o momento da concepção deste trabalho¹, o que contabilizava uma média de uma infração por ano.

Em novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de Fundão, que é uma barragem de rejeitos da Samarco S.A., causando a destruição do subdistrito de Bento Rodrigues, em Mariana, na Região Central de Minas Gerais (Mansur et al., 2016). Além de afetar o espaço físico, destruindo a cultura e história das comunidades, desequilibrou todo um ecossistema adjacente ao acidente, afetando também economia e a vida em sociedade dependente da bacia do rio Doce. Os efeitos da tragédia puderam ser observados desde a jusante da barragem rompida, até a foz do rio Doce, na região costeira do Espírito Santo.

A barragem de Fundão compreendia dois reservatórios independentes para a disposição de rejeitos arenosos (Dique 1) e lama (Dique 2), onde a estimativa da capacidade plena e o tempo de vida útil seria de 79,6 milhões de m³ de rejeito em 15,93 anos, e 32,2 milhões de m³ em 4,96 anos, respectivamente, ocupando uma área de 250 ha (SUPRAM, 2008).

De acordo com IBAMA (2015) a barragem continha 50 milhões de m³ de rejeitos, classificados como sólidos, não perigosos e não inertes, como ferro e manganês. Desse total, 34 milhões de m³ foram lançados de imediato com o rompimento e os 16 milhões restantes foram carreados aos poucos para jusante do acidente.

Inicialmente, esse rejeito atingiu a barragem de Santarém, causando seu galgamento e forçando a passagem de lama por 55 km no rio Gualaxo do Norte até desaguar no rio do Carmo (IBAMA, 2015). O rio do Carmo tem 134 km de extensão e sua foz encontra-se no município de Rio Doce (MG), e quando encontra o rio Piranga, formam o rio Doce (Barbosa et al., 2005). Uma vez no rio do Carmo, os rejeitos percorreram 22 km até o rio Doce, por onde foram carreados até a sua foz no Oceano Atlântico, chegando ao município de Linhares (ES) em 21 de novembro de 2015, totalizando 663,2 km de corpos hídricos impactados (IBAMA, 2015). Os rejeitos eram formados por grande quantidade de substâncias químicas usados no processo de flotação, além de metais e areia (Lopes, 2016).

Durante o processo de finalização do trabalho ocorreu outro rompimento de barragem em Brumadinho (MG) da Vale S.A. Segundo a Vale (2019), até 2016, a Barragem I da Mina Córrego do Feijão recebia rejeitos da mineração, e a partir de então, a mesma foi inativada, mas tendo um volume disposto de 11,7 milhões de m³. O rejeito do rompimento dessa barragem, no dia 25 de janeiro de 2019, está concentrado no córrego Feijão e Carvão, e na sua confluência com o Paraopeba. A empresa ressalta que ao longo do rio Paraopeba até a foz do

¹Durante o processo de finalização do trabalho ocorreu outro rompimento de barragem em Brumadinho (MG) da mineradora Vale S.A.

rio São Francisco está sendo feito o monitoramento, com coletas diárias de água e de sedimentos para análises químicas.

Ainda não há informações divulgadas sobre quais coletores a empresa utilizava na mineração, e talvez, devido ao tempo percorrido da inativação ao rompimento, até mesmo já tenham sido degradados. Pouco se sabe sobre a proporção desse ocorrido e há dúvidas se ele pode ter ultrapassado o caso de Mariana no quesito poluição ambiental. O que se tem de informação no momento é que o rompimento dessa barragem superou o rompimento da barragem de Fundão no número de vidas perdidas devido ao soterramento.

2.2. Beneficiamento do minério de ferro

A mineração de ferro é amplamente explorada no Brasil e representa atividade importante da economia do país. A etapa de separação do minério, basicamente desassocia a matéria prima em minério, rejeito e estéril. Após separação, o minério sofre um tratamento para adequação às exigências do mercado. Segundo a mineradora Samarco (2015), o rejeito é o material sem valor econômico após o beneficiamento do minério, que é armazenado em barragens ou pilhas, e o estéril é o material que envolve o minério, que é removido no processo de lavra, ainda na mina.

Devido à diminuição das reservas de minério de ferro, vê-se a necessidade de otimização de processos que concentrem o produto extraído (Teodoro e Leão, 2004) e que sejam aceitos comercialmente. A técnica de flotação reversa é a mais utilizada entre os processos de concentração de minério de ferro (Teodoro e Leão, 2004). Muitas mineradoras utilizam coletores catiônicos, como a eteramina e eterdiamina, para flotar o quartzo, e o amido, para deprimir o minério (Pires et al., 2003; Silva, 2009) no procedimento para concentrar o produto final.

Segundo Pires et al. (2003), tanto o depressor como o coletor são compostos orgânicos anfipáticos, onde a eteramina vai adsorver o quartzo sobre sua superfície, tornando-o hidrofóbico, promovendo sua flotação e descarte desse rejeito. Ainda de acordo com esses autores, nesse processo, a flotação é chamada de reversa, pois ao se usar um coletor catiônico retira-se o constituinte de menor interesse do produto final, sendo posteriormente destinado à barragem de rejeitos.

Os problemas ambientais relacionados a esses compostos, principalmente os efeitos nos organismos, ainda não foram suficientemente pesquisados, sendo que a intensa exploração do ferro implica em maior geração de rejeitos (Colling e Rizzo, 2017). As aminas utilizadas como agente de flotação na mineração, possuem as seguintes características: corrosividade,

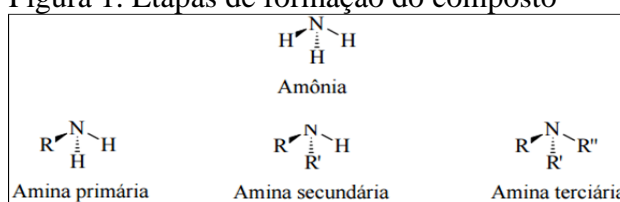
provocando queimaduras quando em contato com a pele e toxicidade para organismos aquáticos (Clariant, 2009a; Clariant, 2014). Portanto, uma das medidas de proteção ao meio ambiente é de que o reagente não atinja os recursos hídricos, sendo complementada com estudos toxicológicos para elucidar o comportamento fisiológico dos animais frente à exposição.

2.3. Toxicologia das eteraminas

Ainda há pouca informação sobre a toxicidade de aminas empregadas no processo de flotação, assim como seu comportamento, uma vez dispostas na barragem de rejeitos. A presença de poluentes em ambientes aquáticos pode alterar a composição físico/química da água, atingindo sua biota, além de interferir nos usos e serviços dos recursos hídricos. As aminas são compostos orgânicos que contêm o grupo NH_2 ligado a um grupo alquil ou aril (Peres et al., 2000). São os coletores catiônicos mais usados na flotação de minérios no mundo (Araújo et al., 2010) sendo que somente as alquilaminas são empregadas nesse processo (Peres et al., 2000).

As aminas são classificadas como primárias, secundárias e terciárias (Colling e Rizzo, 2017), e são formadas a partir da substituição, respectivamente, de um, dois ou três átomos de hidrogênio da molécula de amônia por um radical alquil (Calgaroto, 2014), obtendo diferentes compostos químicos (Fig.1).

Figura 1. Etapas de formação do composto



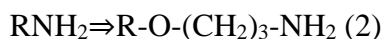
Fonte: <http://www.abc-cosmetologia.org.br>

Na equação 1, observa-se a formação de uma amina primária com a substituição de um hidrogênio por um radical alquil (Peres et al., 2000).



R = radical alquil

Na equação 2, observa-se a formação de uma eteramina genérica, com a introdução de um grupo $\text{O}-(\text{CH}_2)_3$ entre os radicais alquil e o átomo de nitrogênio (Peres et al., 2000).



R = radical alquil

Apesar da presença de um grupo éter aumentar a sua solubilidade (Neder, 2005), a cadeia carbônica é quem apresenta a maior variação entre os coletores, sendo que, quanto maior for a cadeia, menor será a solubilidade da eteramina (Peres et al., 2000).

No mercado mundial, as empresas Akzo Nobel[®] e Clariant[®] apresentam o maior volume de venda de coletores de flotação, sendo os mais utilizados na flotação de ferro, os de fórmula estrutural $[\text{R-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_3^+]^+$, onde o R tem aproximadamente 10 a 14 carbonos (Colling e Rizzo, 2017). Estima-se que o consumo de aminas nos processos de flotação corresponda a 50% dos custos de reagentes no beneficiamento do minério de ferro (Batistelli e Peres, 2008), e que anualmente, sejam empregadas cerca de 5.500 toneladas de compostos derivados de aminas no Brasil (Neder, 2005). Em função do aumento da exploração do minério de ferro, esse valor pode ser bem maior (Colling e Rizzo, 2017), sendo que, após realizarem sua função como coletores catiônicos, são destinadas à barragem de rejeitos.

Nesses locais, tanto na polpa de rejeitos, quanto na água do processo, encontram-se eteraminas em diferentes estágios de degradação (Colling e Rizzo, 2017). Essas substâncias poderiam ter suas funções otimizadas antes do descarte, a partir de um reaproveitamento no processo de flotação, fato que representaria economia no custo de operação (Gonçalves et al., 2009) e uma redução de possíveis impactos ambientais.

Na presença de nitrito ou outro agente de nitrosação, as aminas podem ser convertidas em nitrosaminas (Greim et al., 1998) que são compostos carcinogênicos (Dutra et al., 2007). Apesar de serem biodegradáveis, o processo em si e os produtos formados, não estão completamente compreendidos (Araújo et al., 2010), podendo ocorrer a conversão em outros compostos nitrogenados como nitrato, nitrito e amônia (Teodoro e Leão, 2004), que pode ocasionar sérios problemas ambientais, como eutrofização dos recursos hídricos e intoxicação dos animais aquáticos.

Enquanto o nitrato só se torna tóxico em altas concentrações para organismos aquáticos, a amônia e o nitrito são preocupantes mesmo em baixas concentrações (Baldisseroto, 2002). A amônia pode provocar alterações fisiológicas e histológicas nos rins, fígado, baço e nos tecidos sanguíneos (Wood, 2001), infertilidade, distúrbios imunológicos e genéticos, susceptibilidade a doenças (Suski et al., 2007), além de alterações nas brânquias. Quando sua concentração no ambiente aquático está alta, a excreção branquial de amônia é comprometida, afetando a fisiologia do animal (Arana, 1997).

Segundo Pereira e Mercante (2005), dentro da célula de organismos aquáticos, o NH_3 é transformado em NH_4^+ , liberando hidroxilas, onde esse aumento de amônia no sangue e conseqüentemente do pH, pode ter efeito sobre as enzimas e sobre a estabilidade de membranas. A amônia pode ser tóxica em baixas concentrações em sua fração não ionizada, NH_3 , e menos tóxica aos peixes como forma ionizada, NH_4^+ (Tomasso, 1994). A amônia não ionizada é de natureza lipofílica, difundindo-se livremente pelas membranas celulares causando lesões, já a amônia ionizada é de natureza lipofóbica, penetrando lentamente nas membranas que são lipoprotéicas (Kormanik e Cameron, 1981).

Já o nitrito (NO_2^-) é um composto tóxico para os organismos aquáticos, assim como a amônia (Yanbo et al., 2006), pois provoca a oxidação do ferro da hemoglobina contida nas hemácias, passando-o do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}), denominando-se metahemoglobina, incapaz de transportar oxigênio aos tecidos (Kosaka e Tyuma, 1987), estabelecendo um quadro de hipóxia.

Não existe no Brasil legislação específica sobre aminas em efluentes de mineração. No entanto, a Resolução CONAMA nº 430/11, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, juntamente com a Portaria MS nº 2.914/11, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, fixam teores máximos para algumas substâncias obtidas após seu processo de biodegradação (Tab. 1).

Tabela 1. Valores máximos de compostos nitrogenados para padrões de lançamento de efluentes e qualidade da água para consumo humano na legislação Brasileira

Parâmetros	Valores máximos	
	CONAMA nº 430/2011	MS nº 2.914/2011
N-Nitrato	-	10 mg/L
N-Nitrito	-	1,0 mg/L
Nitrogênio amoniacal	20 mg/L (total)	1,5 mg/L (NH_3)

Fonte: Resolução CONAMA nº 430/2011; Portaria MS nº 2.914/11.

Nos Estados Unidos, existem padrões definidos pela Agência de Proteção Ambiental - USEPA (2002) para a concentração de certas nitrosaminas, que são compostos distintos dos empregados no processo de flotação e muito mais tóxicos que esses, porém, como as eteraminas podem ser convertidas em nitrosaminas (Greim et al., 1998), isso gera uma preocupação por não se ter a certeza sobre quais compostos estão presentes nas barragens de rejeito das mineradoras e sobre suas potenciais toxicidades (Tab.2).

Tabela 2. Limite máximo de concentração de nitrosaminas presentes em águas e organismos aquáticos

NITROSAMINAS	Risco à saúde humana para consumo de:	
	Água + organismos aquáticos	Organismos aquáticos
Poluentes prioritários (µg/L)		
N-N-nitrosodimetilamina	0,00069	3,0
N-nitrosodipropilamina	0,0050	0,51
N-nitrosodifenilamina	3,3	6,0
Poluentes não prioritários (µg/L)		
N-nitrosodibutilamina	0,0063	0,22
N-nitrosodietilamina	0,0008	1,24
N-nitrosopirrolidina	0,016	34

Fonte: National Recommended Water Quality Criteria – USEPA, 2002.

Poluentes prioritários são compostos tóxicos sujeitos a leis regulatórias específicas.

Dos derivados de aminas, praticamente todos são classificados como perigosos. Devido à toxicidade para os organismos aquáticos, a alta demanda química de oxigênio, propriedades corrosivas e alto custo, estudos com a possível remoção e reutilização de eteraminas são importantes (Gusmão et al., 2014). Peres et al. (2000) e Silva (2009) relatam que o composto sofre degradação microbiológica naturalmente após ser destinado para as barragens de rejeito, porém, Colling e Rizzo (2017) afirmam não ser um processo aplicado e estimulado em escala industrial, como os tratamentos biológicos de esgotos e efluentes industriais.

É preciso maior conhecimento acerca dos processos de biodegradação da eteramina ao longo do tempo, e das condições e fatores ótimos para sua catalisação. Devido a sua elevada toxicidade, talvez o tempo de degradação não seja suficientemente rápido, a ponto de não causar grave efeito adverso no ecossistema.

2.4. Impacto sobre a ictiofauna do desastre ambiental da Samarco

Como já mencionado, o acidente desequilibrou o ecossistema adjacente, afetando também a jusante por onde o rejeito tenha passado. Segundo IBAMA (2015), as consequências ambientais relacionadas ao impacto sobre a ictiofauna foram:

Destruição de habitats; contaminação da água com lama de rejeitos; assoreamento do leito dos rios; soterramento das lagoas e nascentes adjacentes ao leito dos rios; destruição da vegetação ripária e aquática; interrupção da conexão com tributários e lagoas marginais; alteração do fluxo hídrico; impacto sobre estuários e manguezais na foz do rio Doce; destruição de áreas de reprodução de peixes; destruição das áreas “berçários” de reposição da ictiofauna (áreas de alimentação de larvas e juvenis); alteração e empobrecimento da cadeia trófica em toda a extensão dos danos; interrupção do fluxo gênico das espécies entre corpos d’água; perda de

espécies com especificidade de habitat (corredeiras, locas, poços, remansos, etc); mortandade de espécimes em toda a cadeia trófica; piora no estado de conservação de espécies já listadas como ameaçadas e ingresso de novas espécies no rol de ameaçadas; comprometimento da estrutura e função dos ecossistemas; e comprometimento do estoque pesqueiro - impacto sobre a pesca (IBAMA, 2015, p.14).

Foram contabilizadas 21 espécies em um monitoramento da mortandade de peixes no trecho de Baixo Guandu a Linhares, entre elas: *Prochilodus* sp. (curimatá), *Pimelodus* sp. (mandi), *Cichla* sp. (tucunaré), *Salminus Brasiliensis* (dourado), *Hoplias* sp. (traíra), *Tilapia rendalli* e *O. niloticus* (tilápias), *Hypostomus* sp. (cascudo), *Pygocentrus nattereri* (piranha), *Metynnis* sp. (pacu CD), *Astyanax* sp. e *Oligosarcus* spp. (lambaris), *Rhamdia quelen* (jundiá), *Lophiosilurus alexandri* (pacamã), *Pseudoplatystoma* sp. (cachara), entre outras (IBAMA, 2015).

Deve-se considerar também que muitos organismos foram simplesmente soterrados, em virtude da descarga sólida e da densidade do rejeito, que aumentou a turbidez da água (IBAMA, 2015), de tal modo que reduziu a penetração dos raios solares interferindo na fotossíntese dos organismos produtores. Afetando os produtores primários, podem-se prejudicar os organismos dependentes desse nível trófico, interferindo negativamente na cadeia alimentar. Além dos organismos consumidores serem afetados pela falta de organismos primários, estes podem ter sofrido com a grande quantidade de material particulado, causando o colapso das brânquias, seguido de morte por asfixia (Lopes, 2016).

As sequelas ao ambiente impactado dependerão da permanência dos sedimentos no meio, da resiliência dos organismos produtores e da importância dessa produção endógena na cadeia trófica aquática como um todo (IBAMA, 2015). Além dos animais terem sido afetados pelo material sólido da mineração, o acetato de eteramina, coletor no beneficiamento do minério de ferro, tem potencial de interferir na comunidade aquática devido à sua toxicidade (Mansur et al., 2016), diferenciando-se da estrutura geral de uma eteramina por conter o grupo acetato (CH_3COO^-) na cadeia (Gusmão et al., 2014).

2.5. Aquicultura e pesca no rio Doce

Enquanto o relatório da SEDRU (MINAS GERAIS, 2016) restringiu a bacia aos municípios diretamente afetados pelos rejeitos, 35 em Minas Gerais e três no Espírito Santo, Viana (2016) propôs um sistema de zoneamento, que considera 226 municípios como pertencentes à bacia (200 mineiros e 26 capixabas), sendo zoneados conforme a distância da

sede municipal em relação à calha do rio. No total são três zonas definidas, sendo: Zona 1, até 5 km; Zona 2, entre os 5 km e 50 km; e Zona 3, entre 50 km e os limites da bacia. Assim, a distribuição nas zonas 1, 2 e 3 são 18, 105 e 103 municípios, respectivamente.

Viana (2017) expõe, a partir de dados do CENSO (2011) e IBGE (2014), corrigidos pelo IPCA para valores de 2015, que em 2010, 215 pessoas trabalhavam direta ou indiretamente com a aquicultura por 19 municípios da bacia. Desses municípios, cinco estavam na Zona 1, quatro na Zona 2, e 10 na Zona 3. Além disso, 1.699 pessoas trabalhavam nas atividades econômicas de pesca em 39 municípios da bacia, sendo 11 na Zona 1, 16 na Zona 2, e 12 na Zona 3. Já em 2014, o número de municípios envolvidos na aquicultura aumentou para 92 municípios, sugerindo uma expansão da atividade.

A partir de dados do Sistema Informatizado do Registro Geral de Pesca - SisRGP do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Viana (2016) estimou o número de pescadores em 3.800 no ano de 2016, que se concentravam em municípios próximos à calha do rio, sendo que os que tiveram maior número de pessoas ocupadas na atividade foram Aracruz, São Mateus e Linhares, todas no Espírito Santo.

Segundo Viana (2017), a atividade de aquicultura, na região média e alta da bacia do Doce, era realizada em municípios distantes da calha do recurso hídrico, enquanto na parte baixa, a atividade estava localizada nas adjacências da calha do rio principal, sob maior risco de impacto. Linhares (ES), município que compreende a foz do rio Doce, foi extremamente impactada. Além de ser um município com um dos maiores números de pessoas ocupadas com a pesca, também participa efetivamente no setor aquícola, sendo que foi um dos 20 municípios brasileiros com as maiores produções de peixe nos últimos anos (IBGE, 2013).

A piscicultura e carcinicultura na bacia se difundiam nas três zonas, sendo que a etapa de engorda se concentrava em municípios da zona 1, enquanto as etapas de larvicultura, alevinagem e recria se dariam em municípios periféricos (Viana, 2017).

Neste contexto, percebe-se a amplitude deste desastre ambiental ao entender que seus efeitos vão além dos afetados diretamente pelo rejeito, sendo propagados ao longo da cadeia de comercialização dos produtos, afetando não apenas os aquicultores e pescadores, como fornecedores de insumos, indústria processadora, restaurantes, entre outros, além do impacto no turismo.

2.6. Testes de toxicidade

Embora o monitoramento de substâncias químicas nos recursos hídricos seja muito importante, analisar apenas parâmetros de qualidade de água não é suficiente para afirmar o

risco de contaminação para os organismos aquáticos. Devido à dinamicidade desses ecossistemas, os parâmetros comumente analisados refletem o estado momentâneo daquele corpo hídrico. Assim, os estudos toxicológicos ganham destaque, complementando as análises físico-químicas, e mostrando-se relevantes na determinação de limiares tóxicos de uma substância.

Testes de toxicidade são experimentos laboratoriais usados para avaliar a toxicidade de um produto, onde organismos são expostos a concentrações conhecidas e a resposta biológica é mensurada, permitindo a avaliação do efeito do produto testado (Ribo, 1997), podendo ser classificados como: agudo ou crônico.

Os testes de toxicidade aguda são usados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre a espécie teste por um curto período de tempo (normalmente até 96 h), estimando a concentração da substância (ABNT, 2016). Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo teste ou população resultante de um estímulo químico, sendo a mortalidade a resposta mais comumente obtida (Gherardi-Goldstein et al., 1990).

Já os testes de toxicidade crônica são usados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre a espécie teste por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo. Com este tipo de teste, pode-se submeter o animal a concentrações sub-letais e observar as respostas metabólicas frente a tal exposição (Gherardi-Goldstein et al., 1990), pois o fato de um agente químico não influenciar no organismo no teste agudo, não significa que não seja tóxico em exposições prolongadas. Podem ainda ser classificados quanto à forma de adição do agente a ser testado: como estático, que é sem renovação da solução teste; semi-estático, que tem renovação periódica do meio testado, e fluxo contínuo (Rubinger, 2009).

No entanto, a padronização de métodos para os testes é uma dificuldade na comunidade científico-acadêmica. Existem normas internacionais ditando como proceder a execução destes (OECD, 1992; USEPA, 2016). No Brasil, os testes são padronizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (2016) para as espécies vairão de cabeça grande (*Pimephales promelas*) e paulistinha (*Danio rerio*), servindo de suporte para a realização de testes de toxicidade com outras espécies de peixes. Assim, os testes de toxicidade podem auxiliar na avaliação de como o composto eteramina age sobre o organismo vivo e no ecossistema.

2.7. Biomarcadores

As alterações promovidas pela presença de poluentes em um ser vivo acontecem em níveis crescentes de organização biológica, do nível molecular para o nível morfofisiológico, até os níveis da população e ecossistema (Stegeman et al., 1992). Assim, aliado aos testes de toxicidade, ferramentas têm sido utilizadas para auxiliar a detecção dos efeitos gerados por compostos tóxicos presentes no ambiente, tais como os biomarcadores.

Biomarcadores são alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares ou teciduais (Walker, 1995), e até mesmo mudanças nos parâmetros comportamentais, que podem ser mensurados, e que indicam a presença de contaminantes (Monserrat et al., 2007), seus possíveis efeitos e a intensidade de acometimento. Por refletir a condição saudável do organismo, são parâmetros relativamente fáceis de mensurar, e considerados importantes nos ensaios toxicológicos, pois podem auxiliar na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos ambientais.

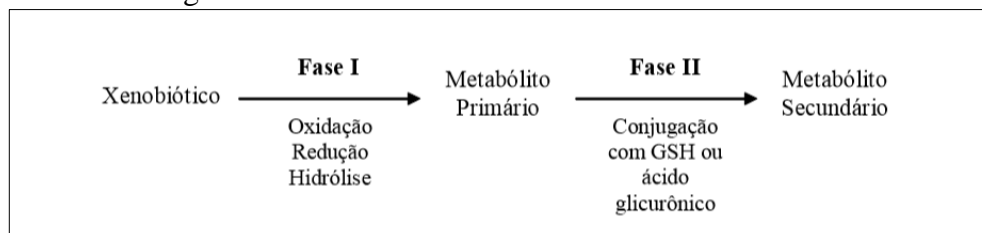
Os biomarcadores de peixes são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático, tendo sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental (Walker, 1995), sendo que seria pertinente a incorporação responsável de análises frequentes destes nas adjacências às empresas de grande potencial poluidor. Entretanto, Martinez (2006) destaca que:

A aplicação ou interpretação imprópria dos biomarcadores pode levar a conclusões equivocadas sobre poluentes e qualidade do ambiente, considerando-se que (1) certas alterações, estabelecidas para uma dada espécie, não são necessariamente válidas para outras espécies; e que (2) dados ecotoxicológicos obtidos em estudos de laboratório nem sempre podem ser usados para traduzir, de forma precisa, os efeitos que podem ocorrer no campo (Martinez, 2006, p.3).

Existem diferentes grupos de biomarcadores, sendo os mais habitualmente usados, os hematológicos, morfológicos, genéticos e bioquímicos. A frequência ventilatória em peixes é mensurada através da observação dos movimentos operculares por minuto, sendo modulada tanto pelo sangue como por PO₂ da água (Schmidt-Nielsen, 1997), onde a presença de xenobióticos pode interferir sobre a FV dos animais.

Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais investigados são os componentes participantes na defesa antioxidante e na biotransformação de xenobióticos (Martinez, 2006), que é um processo de conversão destes compostos, catalisado por enzimas, em formas hidrossolúveis para poderem ser mais facilmente excretados (Van Der Oost et al., 2003), e que usualmente consiste de duas fases (Fig.1).

Figura 2. Fases do metabolismo sobre os xenobióticos



Fonte: Martinez (2006).

Durante a fase I, um grupo polar é introduzido no composto lipofílico, tornando-o um substrato adequado para as reações de fase II, porém alguns xenobióticos possuem grupamentos funcionais (como COOH, -OH ou -NH₂) indo direto para fase II (Martinez, 2006). Na fase II, o metabólito da fase I é combinado com um substrato endógeno para produzir um produto hidrossolúvel que seja excretado (Hodgson e Goldstein, 2001).

Embora ambas as fases estejam geralmente envolvidas a um mecanismo de detoxificação, pode ocorrer bioativação, fenômeno no qual os metabólitos intermediários ou finais podem ser mais tóxicos que os originais (Martinez, 2006). Os efeitos tóxicos de um xenobiótico podem se manifestar quando se liga a macromoléculas celulares levando à ruptura da membrana, danos celulares ou efeitos genotóxicos (Van Der Oost et al., 2003). Durante a biotransformação acontece um efeito paralelo negativo no processo, que é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Lackner, 1998; Martinez, 2006), como o radical superóxido (O₂⁻) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Stegeman et al., 1992).

Caso o sistema de defesa antioxidante esteja comprometido, pode refletir em um desequilíbrio pró-oxidante celular (Lenártová et al., 1997), conhecido como estresse oxidativo, que está associado a vários processos patológicos (Martinez, 2006). Segundo Ferreira e Matsubara (1997), para se proteger a célula ativa dois mecanismos, sendo o primeiro de detoxificação, constituído pelos compostos glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx), vitamina E, entre outros; e o segundo, de reparo da lesão ocorrida, constituído pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GR) e pela GPx, entre outros.

Com relação aos antioxidantes do sistema de defesa envolvidos na proteção celular, estes podem ser divididos em dois grupos: antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GPx, GR, entre outros) e não enzimáticos (GSH, α-tocoferol, ascorbato, entre outros) (Van Der Oost et al., 2003). O primeiro grupo e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio

intracelular, daí a utilização dos eritrócitos para a análise; já os não enzimáticos, localizam-se, principalmente, no meio extracelular, sendo analisados no plasma e soro (Vasconcelos et al., 2007).

De forma resumida, a função dos principais antioxidantes enzimáticos no sistema de defesa seria: CAT - responsável por catalisar a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 ; SOD - tem papel antioxidante, catalisando a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 (Ferreira e Matsubara, 1997); GSTs - catalisam a conjugação de vários compostos com a GSH, e participam também no processo de detoxificação (Martinez, 2006); GR - mantém a glutatona na forma reduzida, e GPx - catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois (Vasconcelos et al., 2007). Os antioxidantes SOD, CAT e GPx são bastante importantes na detoxificação dos oxirradicais para moléculas não reativas, sendo indicadores de estresse oxidativo, assim como os não enzimáticos que podem responder à contaminação ambiental com variações na sua concentração (Martinez, 2006).

Em peixes, as enzimas de biotransformação ocorrem em níveis mais elevados no fígado, podendo ocorrer também nas brânquias e rins (Goksøyr e Husøy, 1998). Como o biomarcador bioquímico analisado no presente estudo foi a GSH, essa ganha destaque entre os antioxidantes não enzimáticos.

A GSH, tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister e Anderson, 1983), é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) que exerce funções essenciais nas células, como ser cofator da GPx, desempenhando papel protetor contra o estresse oxidativo (Shan et al., 1990); detoxificação de xenobióticos e de combate a EROs (Vasconcelos et al., 2007).

Na inativação de um agente oxidante ocorre a produção de dissulfeto da glutatona (GSSG) e a depleção de GSH, sendo que se o sistema oxiredutor estiver íntegro haverá recuperação da GSH (Ferreira e Matsubara, 1997) por GR, etapa essencial para manter em equilíbrio o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (Vasconcelos et al., 2007).

Utilizando o eritrócito como célula alvo para exemplificar o funcionamento do sistema de defesa, o excesso de agentes oxidantes ou a ineficácia nas funções da GSH resultam, além do aumento de GSSG (Ferreira e Matsubara, 1997), na formação de metahemoglobina (MetHb) e conseqüentemente a incapacidade do transporte de oxigênio, além de impedir a passagem para órgãos vitais, devido uma avaria na forma do eritrócito (Vasconcelos et al., 2007).

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), o excesso de GSSG deixa o meio mais oxidante, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupos tiol,

promovendo a oxidação destas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível à custa da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (Gilbert e Mc Lean, 1990), que ao sofrer estresse oxidativo podem ter seus níveis comprometidos. Por ser um tampão redox sulfidrílico, a GSH mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito, no estado reduzido (Ferreira e Matsubara, 1997; Vasconcelos et al., 2007).

Os eritrócitos dos peixes são alvos da lipoperoxidação devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados na membrana e à presença de Hb, que pode funcionar como uma oxidase e uma peroxidase (Martinez, 2006). A membrana dos eritrócitos contém grupos tiol, sendo que agentes oxidantes podem convertê-los em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (Gilbert e Mc Lean, 1990).

A lipoperoxidação e oxidação dos grupos -SH poderão promover a lesão das membranas do glóbulo vermelho, com oxidação da Hb à MetHb (Rice-Evans e Baysal, 1987). Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pelos eventos citados anteriormente, ocorrerá o estresse oxidativo, resultando em hemólise, sendo que esse padrão de agressão e defesa antioxidante podem ser generalizados para grande parte dos tecidos do organismo (Ferreira e Matsubara, 1977).

Biomarcadores hematológicos tem sido ferramenta útil em testes patológicos, toxicológicos e clínicos em geral (Adham et al., 2002), onde variações anormais desses, permitem constatar irregularidades. Vários parâmetros hematológicos em peixes são potenciais biomarcadores, como a Hb, por ser sensível a certos tipos de poluentes (Van Der Oost et al., 2003).

A hemoglobina oxigenada, ou oxiemoglobina, se caracteriza pelo estado reduzido ou ferroso (Fe^{2+}) do ferro inserido no grupo heme (Benesch et al., 1973), sendo capaz de participar da respiração celular. Entretanto, a ação de poluentes ambientais, como o nitrito NO_2^- ; e as EROs das reações metabólicas do organismo, oxidam o ferro mudando-o para o estado férrico (Fe^{3+}), ou MetHb, incapaz de realizar o transporte de oxigênio (Kosaka e Tyuma, 1987; Naoum et al., 2004). Assim, interferências nestes parâmetros hematológicos podem ser utilizadas em estudos toxicológicos indicando alterações fisiológicas frente à exposição à xenobióticos.

Os estudos da estrutura microscópica, composição e função dos tecidos, têm sido utilizados também como biomarcadores morfológicos, mostrando grandes benefícios em função da praticidade e da constatação de efeitos observáveis. As alterações histopatológicas podem ser o resultado de mudanças bioquímicas e fisiológicas adversas em um organismo,

podendo indicar órgãos-alvo, tecidos, células e organelas que estejam afetadas e, em muitos casos, é possível distinguir lesões induzidas por tóxicos, daquelas lesões provenientes de doenças infecciosas (Hinton e Laurén, 1990). No entanto, não é um método específico de determinada contaminação, não conseguindo fechar um diagnóstico isoladamente. Porém, quando associados a outros métodos de análises, podem auxiliar na compreensão de determinadas situações. Bernet et al. (1999) indicam, para peixes, o estudo histopatológico de brânquias, por estarem expostas permanentemente a potenciais agentes tóxicos no ambiente aquático, e o fígado, por ser um órgão essencial ao metabolismo, excreção de metabólitos e osmorregulação.

Neste trabalho foi utilizado como biomarcador bioquímico, o GSH; como morfológico, a histologia; e hematológico, Hb e MetHb, sendo que em conjunto, permitem avaliar as respostas fisiológicas do organismo bioindicador.

2.8.O organismo teste – Tilápia

Além de violar direitos de trabalhadores, agricultores e pescadores, a lama da Samarco atingiu terras indígenas, Krenak (MG), Tupiniquim (ES) e Guarani (ES) (MINAS GERAIS, 2016). A dependência dos recursos hídricos é uma realidade nas vidas dos que foram acometidos pelo acidente, sendo por ser fonte de renda, lazer e até mesmo como forma de subsistência.

Vê-se uma divulgação midiática com relação a viabilidade de tratamentos da água do rio Doce, seja pelo uso de aguapés e até mesmo com biorremediação utilizando microorganismos. Como grande parte dos residentes da bacia sobreviviam da pesca extrativista, uma proposta para ajudar as comunidades afetadas pelo desastre ambiental, seria a criação de peixes em sistemas aquapônicos, captando e tratando a água proveniente do próprio rio Doce, produzindo proteína, juntamente com os vegetais que eles eram habituados a consumir. Vale salientar que para quem já trabalhava com aquicultura, seria interessante o fomento financeiro e o incentivo à adesão de novas tecnologias de produção, para tentar mitigar os impactos gerados.

A atividade de aquicultura tem tido destaque nos últimos anos, e a pesca extrativista se encontra estagnada neste segmento (FAO, 2016). Devido a isso, a produção poderia ser uma opção para região afetada, tanto como fonte alimentar, quanto como fonte de renda, em vista da suspensão da pesca local. Segundo o relatório Globefish Highlights (FAO, 2016), no ano de 2014 a produção de pescado no mercado mundial, por atividade aquícola, foi aproximadamente 73,8 milhões de toneladas. Já no ano de 2015, essa produção aumentou

para 77,5 milhões de toneladas, e continuou crescendo no ano de 2016, na qual a produção atingiu 81,4 milhões de toneladas. Dentro da atividade de produção de pescado no Brasil, a tilápia é o grupo mais criado, com 219,33 mil toneladas em 2015, representando 45,4% do total da produção aquícola nacional, sendo que a produção aumentou 9,7% em relação a 2014 (IBGE, 2016).

Segundo Kubitza e Kubitza (2000), tilápia é a denominação de um grupo com mais de 70 espécies, sendo a maioria delas oriundas da África, onde quatro ganharam destaque na aquicultura mundial: a tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*); a tilápia nilótica (*O. niloticus*); tilápia áurea (*O. aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*O. urolepis hornorum*).

A tilápia (*O. niloticus*) tem sido cada vez mais utilizada em pesquisas toxicológicas, principalmente por seu pequeno porte e por serem facilmente manipuláveis (Jiraungkoorskul et al., 2002; Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Moraes et al., 2018). Sua escolha como organismo teste fundamentou-se na popularidade e robustez da espécie na produção aquícola, destacando características como: aceitação no mercado consumidor, facilidade de manejo em cativeiro, disponibilidade no mercado, aceitabilidade de alimento inerte, resistência a estresse e a baixos níveis de oxigênio, prolificidade, adaptação às condições laboratoriais e ao campo, e o baixo custo na produção desse organismo. Além disso, essa espécie, apesar de não ser nativa, também era encontrada no rio Doce (IBAMA, 2015).

Vale salientar que não é somente o transtorno do material particulado e a eteramina que devem ser solucionados para se utilizar a água do rio Doce, pois de acordo com IBAMA (2015), metais pesados também foram dispostos na água, como o ferro e o manganês.

3.REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro, 2016.
- ADHAM, K.G.; IBRAHIM, H.M.; HAMED, S.S.; SALEH, R.A. Blood chemistry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Aquat. Ecol.*, v.36, p.549-557, 2002.
- AGUIAR, R.M.P. de; NOVAES, A.C.; GUARINO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Quim. Nova*, v. 25, n.6B, p.1145-1154, 2002.
- ARANA, L.V. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis: Editora da UFSC, 1997. 166p.
- ARAÚJO, D.M.; YOSHIDA, M.I.; TAKAHASHI, J.A. et al. Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, v.64, n.2, p.151-155, 2010.

- BALDISSEROTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3.ed. Santa Maria, RS: Editora da UFSM, 2002. 350p.
- BARBOSA, S.E.D.S.; BARBOSA JR., A.R.; SILVA, G.Q.D. et al. Geração de modelos de regionalização de vazões máximas, médias de longo período e mínimas de sete dias para a bacia do rio do Carmo. *Eng. Sanit. Ambient.*, v.10, n.1, p. 64-71, 2005.
- BARRETO, M.L. (Ed). Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 215p.
- BATISTELLI, G.M.B.; PERES, A.E.C. Residual amine in iron ore flotation. *Miner. Eng.*, v.21, p.873-876, 2008.
- BENESCH, R.E.; BENESCH, R.; YUNG, S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*, v.55, p.245-248,1973.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.
- BOWKER, L.N.; CHAMBERS, D.M. The risk, public liability, and economics of tailings storage facility failures. 2015. Disponível em: <https://www.earthworksaction.org/files/pubs-thers/BowkerChambersRiskPublicLiabilityEconomicsOfTailingsStorageFacility%20Failures-23Jul15.pdf>. Acessado em: 22 nov. 2018.
- BRASIL. CONAMA. Resolução nº 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.
- _____.Ministério da Saúde. Portaria nº. 2914/2011. Estabelece as responsabilidades e procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- _____.Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. Brasília: DNPM, 2017.
- CALGAROTO, S. Propriedades interfaciais de nanobolhas e estudos na flotação de quartzo e precipitados coloidais de amina. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CENSO DEMOGRÁFICO 2010. Características da população e dos domicílios: resultados do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_gerais_amostra/resultados_gerais_amostra_tab_uf_microdados.shtm. Acessado em: 24 dez. 2018.
- CLARIANT, FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos em acordo com a NBR-14725 Flotigam EDA 3, 2009a. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- _____.FLOTIGAM EDA C, 2014. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- COLLING, A.V.; RIZZO, A.C.L. Biodegradação de aminas: recuperação ambiental e viabilidade econômica do processo. In: Série Tecnologia Ambiental, 98. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2017. 53p.
- DUTRA, C.B.; RATHS, S.; REYES, F.G. Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.18, n.1, p.111-120, 2007.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. GLOBEFISH HIGHLIGHTS. 2016. Disponível em:

- http://seafoodBrasil.com.br/wpcontent/uploads/2016/09/web_i6094e.pdf. Acessado em: 18 out. 2017.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; GARCIA-SANTOS, S. et al. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.3, 2007.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. et al. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, 1990. 17p.
- GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v.63, p.69-172, 1990.
- GOKSØYR, A.; HUSØY, A. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Eds.). *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1998. p.165-202.
- GONÇALVES, A.A.D.S.; SILVA, F.M.F.; CARVALHO, C.F. Reúso e biodegradabilidade de efluentes gerados na flotação catiônica reversa do minério de ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 49, 2009, Porto Alegre. *Anais Congresso Brasileiro de Química, a Química e a Sustentabilidade*. Rio de Janeiro: ABQ, 2009. 1 CD-ROM. (Resumo).
- GREIM, H.; BURY, D.; KLIMISCH, H.J. et al. Toxicity of aliphatic amines: Structure-activity relationship. *Chemosphere*, v.36, n.2, p.271-295, 1998.
- GUSMÃO, K.A.G.; GURGEL, L.V.A.; MELO, T.M.S. et al. Adsorption studies of etherdiamine onto modified sugarcane bagasses in aqueous solution. *J. Environ. Manage.*, v.133, p.332-342, 2014.
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.). *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Chelsea, USA, 1990.
- HODGSON, E.; GOLDSTEIN, J.A. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (Eds). *Introduction to biochemical toxicology*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2001. p.67-113.
- IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. IBAMA. Minas Gerais, 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf. Acessado em: 07 set. 2017.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 41, p.1-108, 2013.
- _____. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014.
- _____. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016.
- IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. Informações sobre a Economia Mineral Brasileira. 2015. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portaldaminerao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.

- _____.Gestão e Manejo de Rejeitos da Mineração. 1.ed. - Brasília, 2016. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- _____.Economia Mineral do Brasil - março. 2018a. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- _____.Dados sobre Brasil e Estado de Minas Gerais. 2018b. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- _____.Economia Mineral do Brasil - setembro. 2018c. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAMA, E.S.; KRUATRACHUEA, M., et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, v.28, n.2, p.121-127, 2002.
- KORMANIK, G.A.; CAMERON, J.N. Ammonia excretion in animals that breath water: A review. *Mar. Biol. Lett.*, v.2, p.11-23, 1981.
- KOSAKA, H.; TYUMA, I. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhaemoglobin by nitrite. *Environ. Health Perspec.*, v.73, p.147-151, 1987.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. Tilápias: qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade - Parte 1. *Panorama da Aquicultura*, v.10, n.59, p.44-53, 2000.
- LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Eds.). *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, 1998. 21p.
- LENÁRTOVÁ, V.; HOLOVSKÁ, K.; PEDRAJAS, J.R. et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, v.2, p.247-252, 1997.
- LOPES, L.M.N. O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais. *Rev. Sinapse Múltipla*, v.5, n.1, p.1, 2016.
- MANSUR, M.S.; WANDERLEY, L.J.; MILANEZ, B. et al. Antes fosse mais leve a carga: Introdução aos argumentos e recomendações referente ao desastre da Samarco/Vale/Bhp Billiton. In: ZONTA, M.; TROCATE, C. (Orgs.). *A questão mineral no Brasil - v.2 Antes fosse mais leve a carga: Reflexões sobre o desastre da Samarco/Vale/BHP Billiton*. Marabá, PA: Editorial Iguana, 2016. 237p.
- MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Maringá: ABRAPOA, 2006. p.43-62.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, v.52, p.11-60. 1983.
- MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Desenvolvimento Regional, Política Urbana e Gestão Metropolitana. Relatório: avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana-MG. Belo Horizonte: SEDRU, 2016. 289p. Disponível em: <http://www.agenciaminas.mg.gov.br/ckeditor_assets/attachments/770/relatorio_final_ft_03_02_2016_15h5min.pdf>. Acesso em: 24 set. 2018.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.146C, p.221-234, 2007.

- MORAES, A.C.; PRADO, E.J.R.; FOZ, E.P. et al. Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa. *Pesq. Vet. Bras.*, v.38, n.8, p.1570-1576, 2018.
- NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagentes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n.1, p.19-22, 2004.
- NEDER, E.E. O uso das aminas graxas e seus derivados na flotação de minérios Brasileiros. 2005. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. 1992. 10p. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf>. Acesso em: 22 jan 2018.
- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *B. Inst. Pesca*, v.31, n.1, p.81-88, 2005.
- PERES, A.; AGARWAL, N.; BARTALINI, N.; BEDA, D. Environmental impact of etheramine utilized as flotation collector. In: INTERNATIONAL MINE WATER ASSOCIATION CONGRESS – 7th, 2000, Ustron, Poland. *International mine water association Congress*. Richmond: International Mine Water Association, p.464-471, 2000.
- PIRES, J.M.M.; LENA, J.C. de; MACHADO, C.C.; PEREIRA, R.S. Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco mineração: estudo de caso da barragem de Germano. *Vev. Árvore*, v.27, n.3, p.393-397, 2003.
- RIBEIRO, F.A.S.; CARVALHO JUNIOR, J.R.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAYAMA, L. Cadeia produtiva do peixe ornamental. *Panorama da Aquicultura*, v.19, n.112, p.36-45, 2009.
- RIBO, J.M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environ. Toxicol.*, v.12, n.4, p.283-294, 1997.
- RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. *Biochemical J.*, v.244, n.1, p.191-196, 1987.
- RUBINGER, C.F. Seleção de métodos biológicos para avaliação toxicológica de efluentes industriais. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SAMARCO. Relatório Anual de Sustentabilidade 2014. Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<https://www.samarco.com/wp-content/uploads/2016/08/2014-Relatorio-Anual-de-Sustentabilidade.pdf>>. Acessado em: 08 jun. 2018.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. *Animal Physiology: Adaptations and Environment*. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 617p.
- SCORSAFAVA, M.A.; SOUZA, A.; STOFER, M. et al. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.69, n.2, p.229-232, 2010.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.*, v.47, n.1, p.61-71, 1990.

- SILVA, F.M.F. Quantificação de eteraminas em rejeitos da flotação de minério de ferro em função da granulometria. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. 1992. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.). Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. 100p.
- SUPRAM - Superintendência Regional de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. 2008. Parecer Único SUPRAM-ZM. nº: 00015/1984/066/2008. Disponível em: http://200.198.22.171/down.asp?x_caminho=reunioes/sistema/arquivos/material/&x_no_me=Samarco_Minera%E7%E3o.pdf. Acessado em: 19 set. 2018.
- SUSKI, C.D.; KIEFFER, J.D.; KILLEN, S.S.; TUFTS, B.L. Sub-lethal ammonia toxicity in largemouth bass. *Comp. Biochem. Physiol A*, v.146, p.381-389, 2007.
- TEODORO, A.L.; LEÃO, V.A. Recuperação de aminas, utilizadas na flotação de minério de ferro, utilizando-se zeólitas naturais. *REM: R. Esc. Minas*, v.57, n.3, p.197-201, 2004.
- TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Sci.* v.2, n.4, p.291-314, 1994.
- USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. National Recommended Water Quality Criteria. 2002. Disponível em: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>. Acesso em: 01 jan. 2019
- _____. Ecological effects test guidelines 850-1075. Fish acute toxic test, 2016. 19p. Disponível em: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- VALE, 2019. Disponível em: < <http://brumadinho.vale.com/todas-as-noticias.html>>. Acesso em: 04 jan. 2019.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.13, p.57-149, 2003.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.
- VIANA, J.P. Os pescadores da bacia do rio Doce: subsídios para a mitigação dos impactos socioambientais do desastre da Samarco em Mariana, Minas Gerais. Brasília: Ipea, 2016. (Nota Técnica).
- VIANA, J.P. As atividades de pesca e aquicultura na bacia do rio Doce: subsídios para a mitigação dos impactos socioeconômicos do desastre da Samarco em Mariana, Minas Gerais. In: NETO, A. M.; MATA, D.; RIBEIRO, M.B. (Eds). Boletim regional, urbano e ambiental. Brasília: Ipea. 2017.
- WALKER, C.H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments. *Sci. Total Environ.*, v.171, p.189–195, 1995.

- WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: SCHLENK, D.; BENSON, W.H. (Eds). Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London: Taylor and Francis, v.1, 2001. 89p.
- YANBO, W.; WENJU, Z.; WEIFEN, L. et al. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiol. Biochem.*, v.32, p.49-54, 2006.

4.OBJETIVOS

4.1.Objetivo geral

Verificar o efeito da eteramina sobre juvenis de tilápia (*O. niloticus*), por meio de testes de toxicidade aguda.

4.2.Objetivos específicos

- Estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) e os respectivos níveis de segurança para o composto eteramina em juvenis de tilápia (*O. niloticus*).

- Descrever as principais alterações histopatológicas por meio de microscopia ótica, a frequência ventilatória e os parâmetros sanguíneos hemoglobina (Hb) e metahemoglobina (MetHb), e bioquímico glutatona (GSH), causadas pela exposição às diferentes concentrações de eteramina em juvenis de tilápia (*O. niloticus*).

ARTIGO

Efeito toxicológico da eteramina em juvenis de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

O Brasil sentiu, recentemente, as consequências da falta de observância e de medidas preventivas no setor minerário. O rompimento de barragens de rejeito é um risco inerente à indústria de mineração devido à dinâmica econômica do setor. Apesar disto, a atenção dada a essa problemática não tem sido suficiente, visto os repetidos eventos de rompimento de barragens no Brasil e no mundo. Considerando a eteramina um coletor aniônico largamente utilizado no setor minerário brasileiro, e a escassez de estudos sobre seus impactos no ecossistema aquático; o presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis alterações provocadas pela exposição aguda ao composto, por meio de parâmetros bioquímicos, glutatona reduzida (GSH); hematológicos, hemoglobina (Hb) e metahemoglobina (MetHb); fisiológicos, frequência ventilatória (FV); e alterações histopatológicas nas tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas. Juvenis de tilápia ($3,1 \pm 0,3$ cm, $0,6 \pm 0,1$ g) foram expostos a diferentes concentrações de eteramina da água: 0 (controle); 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg/L, por 96 h. Em cada tratamento duplicado, sete peixes foram mantidos em béqueres de 2 L por 96 h, em temperatura aproximada de 28°C, fotoperíodo de 12 h e pH aproximadamente de 7,4. Para a estimativa das concentrações letais medianas (CL_{50-96 h}) foi utilizado o programa “Trimmed Spearman Karber method.” A concentração letal mediana (CL_{50-96 h}) foi de 2,34 mg/L com um nível de segurança de 0,23 mg/L de eteramina, específico para esta espécie. O composto agiu como agente estressor, reduzindo as concentrações de Hb e de GSH, e induzindo a formação de MetHb, e o aumento da FV em tilápias. O estudo histopatológico mostrou os principais efeitos causados nas brânquias e fígado, corroborando no que diz respeito aos cuidados que devem ser tomados com poluentes no ambiente aquático. As principais alterações encontradas nas brânquias foram hiperplasia, hipertrofia, hiperemia, fusão lamelar, desprendimento do epitélio respiratório, aneurismas, entre outros. Sendo que se intensificaram com a exposição às crescentes concentrações de eteramina na água.

Palavras chave: Ecotoxicologia, concentração letal mediana, CL₅₀, estresse oxidativo, mineração.

Toxicological effect of etheramine in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

Brazil, recently, felt the real consequences of lack of observance and preventive measures in the mining sector. The disruption of tailings dams is an inherent risk to the mining industry due to the economic dynamics of this sector. Despite this, the attention given to this problem has not been enough, considering the repeated events of dam breaking in Brazil and in the world. Considering that etheramine is an anionic collector that has been widely used in Brazil in the mining sector, and the scarcity of studies on its environmental impacts, this study aimed to evaluate the possible changes caused by acute exposure to the compound, being biochemical, physiological and histological parameters of the fish species *Oreochromis niloticus* (tilapia). This work presents a preliminary evaluation of the potential of etheramine on living organisms. Tilapia juveniles (3.1 ± 0.3 cm, 0.6 ± 0.1 g) were exposed to different concentrations of etheramine in the water: 0 (control); 0.4; 0.8; 1.6; 3.2 and 6.4 mg/L, for 96 h. In each treatment (in duplicate), seven fish were kept in beakers of 2 L for 96 h at a temperature of approximately 28° C, photoperiod of 12 h and pH of approximately 7.4. For the estimation of the median lethal concentrations (LC_{50-96 h}) the "Trimmed Spearman Karber method" program was used. The median lethal concentration (LC_{50-96 h}) was 2.34 mg/L with a safety level of 0.23 mg/L etheramine, specific for this species. Hemoglobin (Hb), methaemoglobin (MetHb), reduced glutathione (GSH), ventilatory frequency (VF) and histopathological changes were analyzed in the tilapias exposed to increasing etheramine concentrations. This compound acts as a stressor, reducing Hb and GSH concentrations, and inducing MetHb formation, and increasing VF in tilapias. The histopathological study showed the main effects caused in the gills and liver, corroborating with regard to the care that must be taken with pollutants in the aquatic environment. The main alterations found in the gills were hyperplasia, hypertrophy, hyperemia, lamellar fusion, detachment of the respiratory epithelium, aneurysms, among others. Being that they intensified with the increasing concentrations of etheramine in the water.

Key words: Ecotoxicology, median lethal concentration, LC₅₀, oxidative stress, mining.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior exportador de minério de ferro do mundo (Colling e Rizzo, 2017), sendo este minério extraído, principalmente, nos Estados de Minas Gerais e Pará (BRASIL, 2017). O setor mineral de Minas Gerais contribuiu com 63,83% do saldo comercial de todo o Estado, sendo o ferro o principal produto de origem mineral exportado, representando 71% em 2017 (IBRAM, 2018b).

As eteraminas são os coletores catiônicos mais usados na flotação de minérios no mundo (Araújo et al., 2010). Estima-se que seu consumo nos processos de flotação corresponda a 50% dos custos de reagentes no beneficiamento do minério de ferro (Batistelli e Peres, 2008), e que após realizarem sua função como coletores são destinados à barragem de rejeitos. Apesar de serem biodegradáveis, o processo em si e os produtos formados, não estão completamente compreendidos (Araújo et al., 2010), podendo ocorrer a conversão em outros compostos nitrogenados como nitrato, nitrito e amônia, que pode ocasionar sérios problemas ambientais, como eutrofização dos recursos hídricos (Teodoro e Leão, 2004; Scorsafava et al., 2010), e intoxicação dos animais aquáticos.

No contexto Brasileiro de exploração de recursos naturais em prol do desenvolvimento humano, temos elencado alguns acidentes ambientais frequentes, envolvendo o setor minerário. Em 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos de Fundão da Samarco Mineração S.A., *joint-venture* da Vale e da BHP Billiton, causando a destruição do subdistrito de Bento Rodrigues, em Mariana, na Região Central de Minas Gerais, Brasil. Foi um desastre ambiental que além de afetar o espaço físico, destruindo a cultura e história das comunidades, desequilibrou todo um ecossistema adjacente ao acidente, afetando também economia e a vida em sociedade dependente do rio Doce.

A barragem continha 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração, onde deste total, 34 milhões de m³ foram lançados de imediato com o rompimento e os 16 milhões restantes foram carregados, aos poucos para jusante do acidente (IBAMA, 2015). Nesse montante, o coletor utilizado no beneficiamento, acetato de eteramina, estava presente (Mansur et al., 2016).

A presença de poluentes em ambientes aquáticos pode alterar a composição físico/química da água, atingindo sua biota, além de interferir nos usos e serviços dos recursos hídricos. As incertezas quanto à presença de eteramina, por serem biodegradáveis, e sobre os efeitos causados por elas, quando da ocorrência de possíveis vazamentos e/ou rompimento das barragens de rejeitos, merecem maior atenção e monitoramento.

A importância do presente estudo reside no fato de que o olhar para natureza como mera condição de produção pelo setor minerário não esta mais sendo admissível. O efeito tóxico agudo da eteramina permanece desconhecido para a maioria dos organismos aquáticos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos: estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) da eteramina para juvenis de tilápia, assim como os seus respectivos níveis de segurança; descrever as principais alterações histopatológicas causadas; e avaliar a influência da eteramina sobre: a frequência ventilatória, parâmetros bioquímicos e hematológicos, das tilápias expostas ao referido contaminante, no intuito de avaliar possíveis efeitos deletérios aos animais.

2.MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com o protocolo de nº 329/2018.

2.1.Instalações e condições experimentais

O trabalho foi desenvolvido no setor de maricultura do laboratório de Aquicultura – LAQUA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. O trabalho de processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG. Os animais utilizados no experimento foram obtidos do Laboratório de Piscicultura do Instituto Federal Minas Gerais – IFMG, Campus de Bambuí e mantidos no laboratório de maricultura em caixas de polietileno de 2000 L durante o período de aclimação de uma semana. Os animais foram alimentados três vezes ao dia (8:00, 13:00 e 18:00 h) com ração para peixes onívoros (Pirá, GUABI), mantidos em temperatura de 28°C. As caixas foram abastecidas com água proveniente de poço artesiano, fotoperíodo de 12 h, adaptadas com aeração por meio de difusores de ar.

A definição das concentrações de eteramina a serem testadas se deu por meio de teste toxicológico agudo preliminar, baseados em uma concentração inicial, CL_{50-96 h} de 7,81 mg/L, definida para o peixe *Danio rerio* do produto Flotigam EDA C 100% (Clariant, 2014). Para o teste preliminar (96 h), três juvenis de *O. niloticus* (3,1±0,3 cm, 0,6±0,1 g) foram mantidos em béquer de vidro (2 L), nas cinco concentrações testadas e um controle, sem réplica. Os recipientes foram acondicionados em câmara de germinação BOD (SL-224) com controle de temperatura (28°C) e fotoperíodo de 12 h, com aeração constante (Fig.1).

Figura 1. Teste de toxicologia aguda realizado em câmara de germinação BOD (SL-224)



Fonte: Daniele Salgueiro de Melo (2018).

O teste foi realizado com o intuito de se definir a faixa letal para os juvenis de tilápias. As concentrações dos testes definitivos foram definidas tendo como limite inferior, aquela que não apresentasse mortalidade e como superior, a menor concentração que apresentasse 100% de mortalidade no teste preliminar. A partir do conhecimento da faixa letal de exposição foram iniciados os testes de toxicidade aguda definitivos.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos com duas repetições, sendo que as concentrações nominais testadas foram: 0 (controle = sem adição de contaminante); 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 mg/L de eteramina, obtidas a partir de soluções estoques de Flotigam EDA C 100%. Sete juvenis de *O. niloticus* ($3,1 \pm 0,3$ cm, $0,6 \pm 0,1$ g) foram dispostos em cada unidade experimental, béquer de vidro (2 L), conforme as normas da OECD (1992), USEPA (2016) e ABNT (2016), sendo posteriormente acondicionados em câmara de germinação BOD (SL-224) com controle de temperatura ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo de 12 h, e aeração constante.

Diariamente foram feitas renovações totais da solução testada, caracterizando um teste de toxicidade semi-estático. Durante o experimento foi oferecido ração para peixes onívoros (Pirá, GUABI), três horas antes da renovação total dos meios, com o intuito de evitar o comportamento agressivo dos animais e retirada da excreta nitrogenada. A água utilizada foi obtida de poço artesiano do LAQUA, e a duração do teste foi de 96 h. Ao longo do teste, os animais sem movimento observável foram retirados dos recipientes e as mortalidades foram registradas.

2.2. Análises físico-químicas da água

A cada 24 h foram registrados, de todas as unidades experimentais, os dados de pH e temperatura com pHmetro portátil (Hanna[®], modelo HI 98130), o oxigênio dissolvido (OD) com oxímetro portátil (YSI 550A), alcalinidade pelo método titulométrico e amônia por espectrofotometria no espectrofotômetro Biochrom Libra S22 (APHA, 1992).

2.3. Frequência ventilatória

A frequência ventilatória foi observada a partir do batimento opercular de 4 animais por unidade experimental, com auxílio de um cronômetro, com intervalos de 24 h e duração de um minuto de observação (baseado em Alvarenga e Volpato, 1995). Os peixes foram colocados em béqueres de 100 mL e aclimatados durante cinco minutos antes de cada contagem, para evitar possíveis modificações nos resultados. Após as observações os peixes eram retornados para as unidades experimentais respectivas.

2.4. Estudo hematológico

Para análise dos parâmetros sanguíneos, foram utilizados quatro animais de cada unidade experimental. A coleta de sangue foi feita dos peixes que morreram em decorrência da exposição à eteramina, e ao final das 96 h dos que sobreviveram, para completar oito animais por tratamento. Os que não morreram nas 96 h foram eutanasiados por secção medular, seguido de exsanguinação, sendo coletado um volume sanguíneo para analisar hemoglobina (Hb), metahemoglobina (MetHb) e glutatona (GSH).

Após eutanasia, foi coletado sangue com capilares heparinizados e acondicionado em microtubos para determinação de Hb e MetHb (Naoum et al., 2004), e GSH (Beutler et al., 1963), no espectrofotômetro Biochrom Libra S22.

2.5. Estudo histológico

Para o tratamento do material biológico foi utilizada a metodologia descrita por Luna (1968). Dos animais coletados para estudo hematológico foi retirado o segundo arco branquial e o fígado. Os órgãos foram fixados em líquido de bouin, por 8 h, e transferidos para álcool 70%. Posteriormente, foi feito o processamento histológico seguindo os processos de desidratação em séries crescentes de álcoois, diafanização em xilol, impregnação e inclusão do animal em parafina. As peças foram seccionadas em micrótomo com cortes de 5 µm de espessura para montagem das lâminas e coradas em hematoxilina e eosina (HE). Os

preparados foram montados com Entellan New, observados e fotografados através de microscópio óptico (Leica DM 4000B, software LAS V4.8).

As alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet et al. (1999). As análises foram realizadas utilizando-se o Índice do Órgão (Fig. 2), calculado com os respectivos fatores de importância da lesão (w), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando cessado a exposição a agentes estressores; (2) importância moderada, reversível na maioria dos casos, se o estressor for neutralizado; e (3) marcada como patológica importante, geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. Além do fator de importância, o grau de ocorrência (α) também é considerado nos cálculos, onde são atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) inalterado, (2) ocorrência ocasional, (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência severa.

Figura 2. Índice do órgão (I_{org}). Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração)

$$I_{org.} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Fonte: Bernet et al. (1999).

2.6. Análise estatística e tratamento dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. As médias das variáveis físico-químicas e das concentrações testadas foram analisadas quanto à normalidade (Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Levene). Os dados obtidos dos parâmetros físico-químicos foram analisados usando ANOVA com o pacote estatístico Infostat (versão 2017). Para os outros parâmetros do experimento foi feita análise de regressão linear para os dados, e para o índice de órgão foi feito o teste de Bonferroni ($P < 0,01$).

As concentrações letais medianas (CL_{50}) foram estimadas com o uso do programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977), e o nível de segurança, que é a concentração de um contaminante que não tenha um efeito adverso sobre os organismos expostos, foi obtido segundo metodologia proposta por Sprague (1971).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação às variáveis físico-químicas da água (Tab.1).

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão - d.v.) dos parâmetros de qualidade da água durante o período de 96 h de exposição dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) a diferentes concentrações de eteramina

Parâmetros de qualidade de água	Eteramina (mg/L)					
	Controle (0)	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
OD (mg/L)	5,73 \pm 0,22	5,73 \pm 0,02	5,73 \pm 0,09	5,65 \pm 0,04	5,79 \pm 0,08	5,68 \pm 0,03
Temperatura (°C)	28,01 \pm 0,04	28,03 \pm 0,03	28,02 \pm 0,01	28,01 \pm 0,01	28,03 \pm 0,01	28,05 \pm 0,01
pH	7,03 \pm 0,01	7,05 \pm 0,01	7,04 \pm 0,01	7,04 \pm 0,01	7,04 \pm 0,01	7,04 \pm 0,01
Alcalinidade	100,5 \pm 0,71	101 \pm 1,41	100,5 \pm 0,71	100,5 \pm 0,71	101 \pm 0,01	100 \pm 0,01
N-AT (mg/L)	0,65 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,67 \pm 0,06	0,70 \pm 0,03

Os parâmetros de qualidade de água neste estudo se encontravam em conformidade com as condições de cultivo para as tilápias. Esses organismos apresentam conforto térmico entre 27 a 32°C; com valor ótimo de pH da água de 6 a 8,5; e a concentração de amônia não ionizada de 0,20 mg/L deve servir como alerta na produção (Kubitza e Kubitza, 2000).

3.1.Sobrevivência e CL₅₀

Não foi observado mortalidade no grupo controle, e no tratamento de maior concentração (6,4 mg/L), todos os animais morreram antes de completar as 96 h de teste (Fig. 3).

Foi possível observar o efeito da eteramina na sobrevivência dos animais já nas primeiras 48 h de exposição em todas as concentrações. A CL₅₀-48 h foi estimada em 3,68 mg/L de eteramina (Tab. 2).

Devido à falta de pesquisas com o produto envolvendo seu potencial ecotoxicológico, não foi possível fazer comparações inter e intraespecíficas. Segundo a FISPQ do composto utilizado, Flotigam EDA C (Clariant, 2014), a CL₅₀-96 h para peixes, utilizando *Danio rerio* como modelo experimental, foi de 7,81 mg/L de eteramina. As tilápias se mostraram menos tolerantes a este xenobiótico, pois a CL₅₀-96 h do presente estudo foi de 2,34 mg/L de eteramina. As CL₅₀-96 h de diferentes eteraminas usadas na mineração para *D. rerio*, foram

de 3,58 mg/L para Flotigam EDA 3 e Flotigam EDA 3C (Clariant, 2009a; Clariant, 2009b), e < 1 mg/L para Flotigam 2835-2 (Clariant, 2009c); ressaltando o potencial tóxico deste grupo.

Figura 3. Valores médios e desvio padrão da sobrevivência de tilápias (*O. niloticus*) expostas a níveis crescentes de eteramina

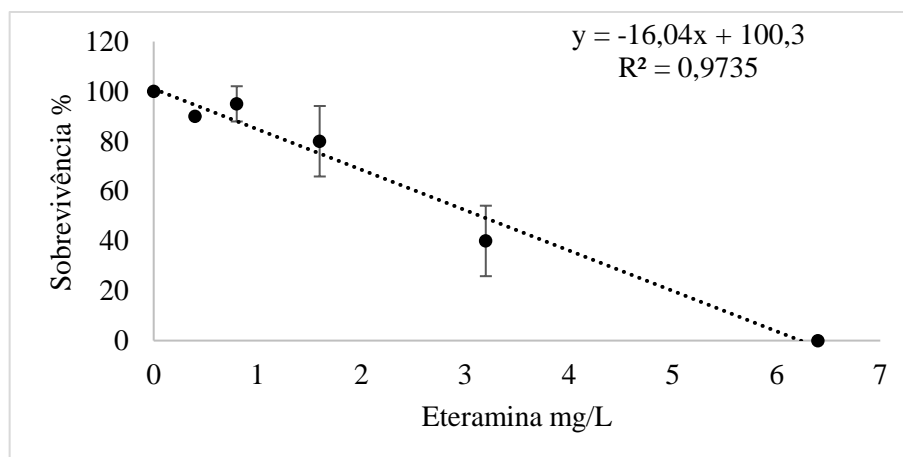


Tabela 2. Valores estimados das CL₅₀ (concentrações letais medianas) da eteramina sobre juvenis de tilápia (*O. niloticus*). Valores somados aos respectivos intervalos de confiança (IC) e o nível de segurança (NS) em 96 h

Tempo (h)	CL ₅₀ eteramina (mg/L)	NS eteramina (mg/L)
24	-	-
48	3,68 (3,12-4,32)	-
72	2,99 (2,41-3,71)	-
96	2,34 (1,87-2,94)	0,23

Como as eteraminas podem ser convertidas à outros compostos nitrogenados, como nitrito e amônia (Scorsafava et al., 2010), optou-se por comparar os resultados encontrados no presente estudo com estes compostos, por serem substâncias que ganham destaque quando se fala em animais aquáticos devido ao seu potencial de intoxicação (Tab. 3).

Cardoso et al. (1996) e Santos-Silva et al. (2017) encontraram CL₅₀ de N-NH₃ distintas para uma mesma espécie de estudo, *Lophiosilurus alexandri*, devido as fases de desenvolvimento diferentes, que é um fator importante para se interpretar testes de toxicidade. Normalmente, alevinos tendem a ser menos tolerantes quando expostos à diferentes substâncias nesse tipo de estudo, como foi o caso. A piava (Copatti et al., 2015), dos peixes mencionados na tabela 3, foi o menos tolerante à amônia, o que sugere a diferenciação do metabolismo frente à intoxicação.

Tabela 3. Valores das CL₅₀ (concentrações letais medianas) de N-NH₃ e NO₂ para diferentes espécies de peixes.

Espécie	Peso (g)	CL ₅₀ N-NH ₃ (mg/L)		CL ₅₀ NO ₂ (mg/L)		Referência
		48 h	96h	48 h	96 h	
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	0,4	0,92	-	-	-	Cardoso et al. (1996)
<i>L. alexandri</i>	33,87	4,57	3,66	-	5,86	Santos-Silva et al. (2017)
<i>O. niloticus</i>	0,056	1	-	-	-	Benlí e Köksal (2005)
<i>O. niloticus</i>	10,11	7,4	-	-	-	Benlí e Köksal (2005)
<i>O. niloticus</i>	1,8	-	-	-	28,18	Yanbo et al. (2006)
<i>Rhamdia quelen</i>	11,04	-	2,09	-	195,3	Miron et al. (2008)
<i>Leporinus obtusidens</i>	26	-	0,27	-	-	Copatti et al. (2015)
<i>Gadus macrocephalus</i>	0,018	1,72	-	-	304,71	Wang et al. (2015)

A eteramina apresentou CL₅₀ de N-NH₃ superior às CL₅₀ das espécies destacadas na tabela 3, pacamã (Cardoso et al., 1996), jundiá (Miron et al., 2008) e piava (Copatti et al., 2015). Isso sugere que a amônia não ionizada, composto encontrado naturalmente em ambientes aquáticos, foi mais tóxica, nas referidas espécies, do que a eteramina em tilápias. Fato que não ameniza seu potencial poluidor, pois seus resultados também são considerados preocupantes pelo potencial tóxico apresentado. Vale salientar que segundo Vieira (2010), as espécies anteriormente citadas são nativas, onde o gênero *Leporinus* spp., e as espécies *R. quelen* e *L. alexandri*, eram frequentemente encontrados no rio Doce e seus afluentes.

Para mesma espécie do presente estudo, Benlí e Köksal (2005) mostram que a tilápia é um organismo com elevada tolerância à amônia. Indicando, portanto, que a eteramina é um composto que pode causar mais danos do que a amônia não ionizada nesta espécie.

A amônia não ionizada é de natureza lipofílica difundindo-se livremente pelas membranas celulares causando lesões (Kormanik e Cameron, 1981). Dentro da célula, o NH₃ é transformado em NH₄⁺, liberando hidroxilas e interferindo sobre pH sanguíneo, que pode ter efeito sobre as enzimas e sobre a estabilidade de membranas (Pereira e Mercante, 2005).

Uma vez no ambiente aquático a amônia é oxidada, principalmente por bactérias *Nitrosomonas* spp., a nitrito (NO₂⁻), esse por sua vez pode posteriormente ser oxidado a nitrato (NO₃⁻), desta vez pela ação predominante de bactérias *Nitrobacter* spp. (Martinez et al., 2006). Esta última é a forma nitrogenada menos tóxica para os organismos aquáticos, já o nitrito é um composto extremamente tóxico, assim como a amônia (Yanbo et al., 2006). Segundo Kosaka e Tyuma (1987), o nitrito pode provocar a oxidação do ferro presente na

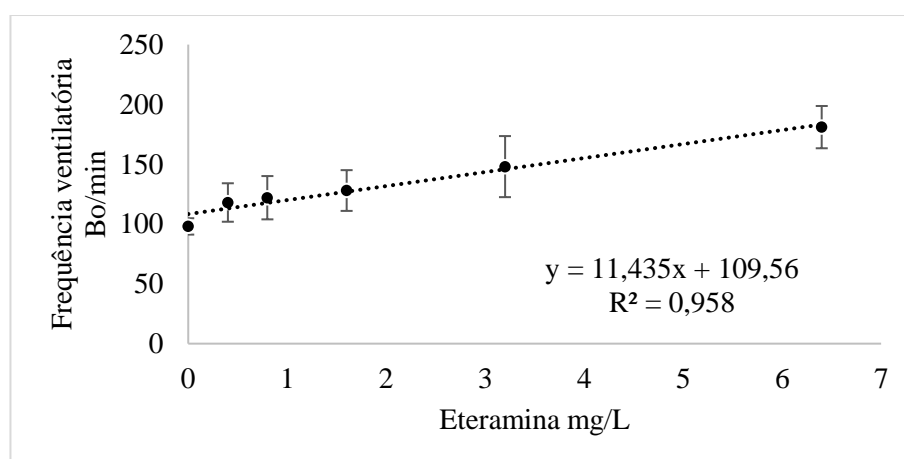
molécula de Hb, transformando-a em MetHb, incapaz de transportar oxigênio aos tecidos, estabelecendo um quadro de hipóxia.

A toxicidade do nitrito depende do pH e da concentração de cálcio e de cloretos na água (Queiroz e Boeira, 2007), devido à competição destes pelo mesmo transportador nas células de cloreto das brânquias (Williams e Eddy, 1986). Comparando os níveis letais de outras espécies com a tilápia, foi possível constatar uma maior tolerância ao efeito tóxico do nitrito, devido a condição de baixa salinidade (Yanbo et al., 2006), ficando atrás do *Gadus macrocephalus* (bacalhau) (Wang et al., 2015), que estavam em diferentes estágios de desenvolvimento, mas provavelmente por ser uma espécie de ambiente marinho apresentava uma maior tolerância. Em comparação com a CL₅₀ da eteramina, os resultados mostraram que o referido composto pode causar mais danos do que o nitrito nesta espécie.

3.2.Frequência ventilatória

A frequência ventilatória (FV) pré-exposição foi similar entre os peixes, apresentando uma média de 89,66 Bo/min. Nosso estudo mostrou que as FV aumentaram de acordo com aumento das concentrações de eteramina (Fig. 4).

Figura 4. Valores médios e desvio padrão de frequência ventilatória (Bo/min) de tilápias (*O. niloticus*) expostas a níveis crescentes de eteramina



A FV basal para alevinos de tilápia de aproximadamente 14,5 cm varia de 69 a 81 Bo/min (Volpato et al., 1989; Barreto e Volpato, 2006), e para alevinos de aproximadamente 6,8 cm é de 120 Bo/min (Alvarenga e Volpato, 1995). A FV é inversamente proporcional ao tamanho do corpo do animal (Schmidt-Nielsen, 1997), mas em condições em que há o suprimento ótimo de oxigênio, como é o caso do presente estudo, onde a média de OD foi de 5,7 mg/L, os peixes podem apresentar reduzida taxa de ventilação branquial, e assim uma

considerável economia de energia, pois bombear água através das brânquias implica em considerável gasto energético (Perry, 1997). Sendo assim, há adequação das medidas basais fisiológicas, pré-exposição, encontradas no presente estudo.

Pesquisas com avaliação de FV em peixes frente à exposição à xenobióticos não são muito comuns. No entanto, *Cyprinus carpio* (carpa comum) expostas a amônia não ionizada (Kadhim e Al-Faragi, 2018) e em estudos com tilápias expostas a estressor social (Volpato et al., 1989; Alvarenga e Volpato, 1995), confinamento (Barreto e Volpato, 2004), e ao confinamento e estressor social (Barreto e Volpato, 2006), também mostraram aumento da FV.

A ventilação em peixes é modulada tanto pelo sangue como por PO₂ da água (Schmidt-Nielsen, 1997), onde o sangue com baixo PO₂ induz um aumento na FV (Nonnotte et al., 1993). Histopatologias branquiais podem auxiliar na interpretação de dados de FV em estudos toxicológicos. Uma das lesões histopatológicas encontradas foi o desprendimento epitelial, que aumenta a distância entre a água e o sangue, comprometendo a respiração branquial (Thophon et al., 2003), devido a dificuldade em ocorrer as trocas gasosas. No entanto, nessas condições, os peixes aumentam sua taxa de respiração compensando a baixa entrada de oxigênio (Emmanouil et al., 2008).

Assim, o aumento da FV, em conjunto com as lesões histopatológicas branquiais do presente estudo, pode ser interpretado como um mecanismo adaptativo da tilápia na tentativa de transportar mais oxigênio para o corpo, devido a uma possível dificuldade de captação do oxigênio da água, após alterações em seu metabolismo e na estrutura lamelar causadas pela exposição ao xenobiótico.

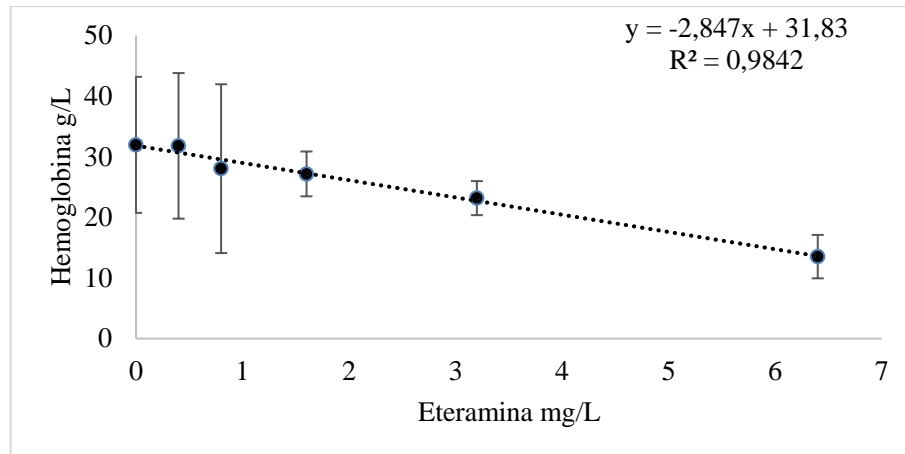
3.3. Biomarcadores hematológicos

A Hb do tratamento controle teve uma média de 3,2 g/dL. Este estudo mostra que a Hb foi inversamente proporcional às concentrações de eteramina, onde esse xenobiótico induziu a redução do parâmetro (Fig. 5).

A hemoglobina está presente nos eritrócitos, cuja função principal é o armazenamento e transporte de oxigênio (OMS, 2013). Níveis normais de Hb para os peixes seria a distribuição de sua concentração encontrada em um grupo representativo de animais saudáveis, no entanto, é difícil o estabelecimento do intervalo de valores normais para os parâmetros sanguíneos. Parâmetros hematológicos de peixes variam inter e intraespécies e tais variações podem ser em decorrência de fatores abióticos, como a temperatura, OD, ciclo sazonal, estresse e fatores endógenos (Ranzani-Paiva, 1999). Por isso a dificuldade de se ter um padrão

de comparação para garantir a interpretação dos resultados. Devido a isto, grupos controle no delineamento experimental do estudo são essenciais para avaliar comparativamente estes parâmetros.

Figura 5. Valores médios e desvio padrão das concentrações de hemoglobina (g/L) das tilápias (*O. niloticus*) expostas a níveis crescentes de eteramina



A carpa *Cirrhinus mrigala* exposta ao nitrito apresentou 7,0 g/dL de Hb no controle, mas o parâmetro foi reduzido em 50% após exposição a 10,4 mg/L de NO₂ (Das et al., 2004), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), exposto ao sulfato de cobre (Tavares-Dias et al., 2002), e o linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), exposto ao fenantreno (Jee et al., 2004), são exemplos de peixes expostos à poluentes que apresentaram resultados semelhantes aos da tilápia, ou seja, o decréscimo dos níveis de Hb após serem submetidos às condições estressoras, pode ser um indicativo de um quadro anêmico.

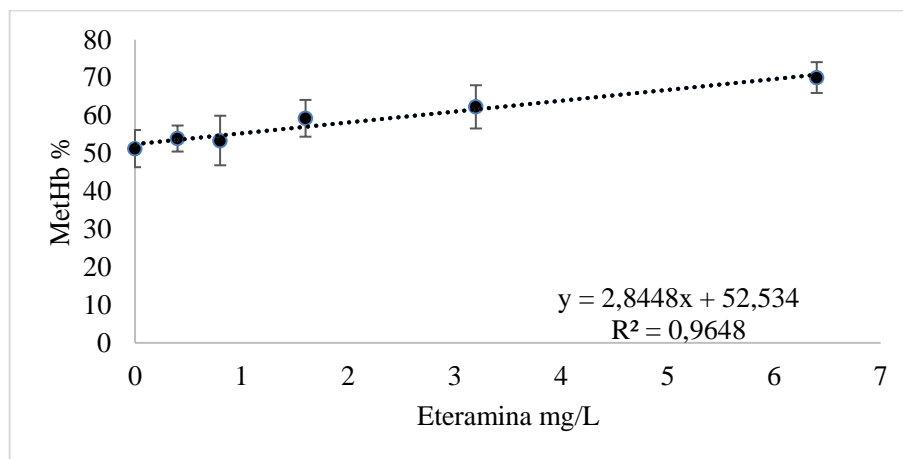
No entanto, tilápias *O. niloticus* expostas às concentrações de mercúrio apresentaram valores de Hb entre 4,0 e 6,2 g/dL no controle, com aumento deste parâmetro na maior concentração de mercúrio testada (0,02 mg/L) (Ishikawa et al., 2007). Em resposta à dificuldade respiratória, normalmente o organismo estimula o aumento dos eritrócitos e Hb como mecanismo para aumentar a transferência de oxigênio (Affonso et al., 2002).

A perda de glóbulos vermelhos reduz a quantidade total de Hb na circulação, reduzindo a capacidade de armazenamento de oxigênio no sangue (OMS, 2013). De acordo com Jee et al., (2004), a baixa taxa de Hb poderia ser causada por sua destruição ou por um decréscimo na sua taxa de síntese. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que boa parte da Hb foi transformada em MetHb, justificado pelo aumento de MetHb nos tratamentos expostos à eteramina. Portanto, supõe-se que o composto atue sobre os eritrócitos dos peixes, e

consequentemente na capacidade de transporte de gases, fato observado também com peixes expostos ao nitrito.

O resultado de MetHb no grupo controle ficou entre 45,36 e 54,64%. Este estudo mostra que os níveis de MetHb aumentaram de acordo com às concentrações de eteramina (Fig. 6).

Figura 6. Valores médios e desvio padrão de metahemoglobina (MetHb) (%) em tilápias (*O. niloticus*) expostas a níveis crescentes de eteramina



Segundo Martinez (2006), sob condições normais, uma pequena proporção da Hb existe como MetHb, forma incapacitada de realizar o transporte de oxigênio devido ao estado oxidado do ferro (Fe^{3+}). Segundo os autores, a enzima metahemoglobina redutase quem atua na redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , regenerando a hemoglobina viável.

Entretanto, muitos xenobióticos como nitrito (Kosaka e Tyuma, 1987) compostos organoestânicos, metais pesados e poluentes ambientais podem aumentar a formação de MetHb (Lackner, 1998). Segundo Ellis (1984), peixes expostos a NO_2 podem apresentar alterações hematológicas, devido à facilidade de absorção da substância pelas brânquias, chegando facilmente aos receptores presentes nas membranas das células branquiais, oxidando a Hb, e transformando-a em MetHb. Devido a conversão da eteramina em outros compostos nitrogenados como nitrito (Scorsafava et al., 2010), supõe-se comportamento similar a este composto.

Portanto, concentrações aumentadas de MetHb representam um indicador da exposição a contaminantes (Stegeman et al., 1992), entretanto, não há muitos estudos avaliando este parâmetro frente a exposição de peixes à poluentes, sequer pesquisas com a eteramina. Apesar disso, a MetHb é um biomarcador de simples quantificação e de resposta representativa.

Em tilápias (*Tilapia aurea*) expostas ao NO_2^- , os níveis de MetHb aumentaram com as concentrações crescentes de nitrito, onde os autores obtiveram aproximadamente 10% no controle e 70% após exposição à 12,2 mg/L em 24 h, resultado similar ao presente estudo (Palachek e Tomasso, 1984). Yanbo et al. (2006) expondo tilápias (*O. niloticus*) também à NO_2^- , observaram com o controle e com a concentração de 20 mg/L, valores de MetHb entre 2 e 85% da Hb, respectivamente. Apesar do controle do presente estudo estar superior aos destacados por esses autores, os resultados são similares a Perrone e Meade (1997) trabalhando com salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), com maior valor para o controle, aproximadamente 30%, e o incremento da MetHb com a crescente exposição às concentrações de NO_2^- . Apesar disto, o fato de o controle ter resultado em aproximadamente 50% de MetHb, pode sugerir que os animais estavam estressados, provavelmente devido ao confinamento.

Experimentos realizados com *Hoplosternum littorale* (caborja) e *Colossoma macropomum* (tambaqui) como resultado da exposição ao petróleo cru e sua fração solúvel na água (Almeida-Val et al., 2002), e com tambaqui exposto ao NO_2^- (Costa et al., 2004), também encontraram um aumento nos níveis de MetHb. A tendência de resposta desse parâmetro nesses trabalhos coincide com o presente estudo, pois, como comentado anteriormente, os resultados sugerem que boa parte da Hb foi transformada em MetHb, justificado pelo incremento de MetHb proporcional às crescentes concentrações da eteramina, que poderia afetar seriamente a homeostase e a troca gasosa dos peixes (Almeida-Val et al., 2002).

3.4. Biomarcador bioquímico

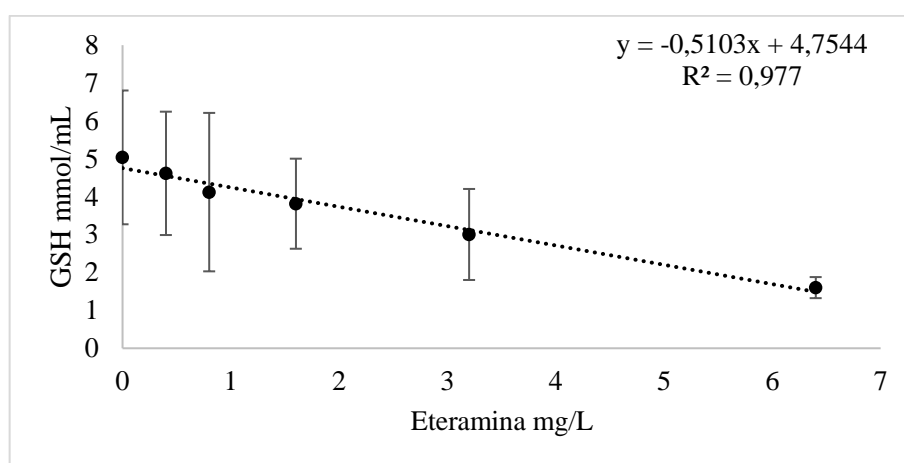
O resultado de GSH no grupo controle foi de 5,03 mmol/mL. Este estudo mostra que a GSH também apresentou uma diminuição proporcional às concentrações de eteramina (Fig. 7).

A glutationa nas células está presente, predominantemente, na forma reduzida (GSH), é um dos componentes mais importantes do sistema de defesa da célula, pois suas funções envolvem a prevenção dos efeitos da oxidação, inibindo o início do processo de lipoperoxidação, combatendo radicais livres (Ferreira e Matsubara, 1997), além de ser cofator essencial para GPx e GST (Ross, 1988).

Segundo Lenártová et al. (1997), o dano oxidativo causa um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o próprio sistema de defesa antioxidante do animal, sendo que, mesmo assim, os peixes expostos a xenobióticos tendem a se ajustar às condições de estresse

oxidativo, como reflexo de um processo de adaptação. Essa resposta esta geralmente acompanhada da indução das enzimas de defesas antioxidantes, com a concomitante interferência na concentração de compostos antioxidantes não enzimáticos, como GSH (Martinez, 2006), fato observado neste estudo. Em condições de estresse oxidativo, a GSH converte-se em GSSG, levando a uma diminuição da razão GSH/GSSG, que seria a GSH total (Ferreira e Matsubara, 1997).

Figura 7. Valores médios e desvio padrão de GSH (mmol/mL) de tilápias (*O. niloticus*) expostas a níveis crescentes de eteramina



O que geralmente se observa nas pesquisas com este biomarcador é que decréscimos na sua concentração correspondem a uma reação aguda, enquanto o seu aumento representaria uma adaptação à expansão da atividade de detoxificação (Martinez, 2006). Estudos mostraram tendências de redução de GSH ao exporem a tilápia *O. niloticus* a efluentes de suinocultura (Lima et al., 2006), ao cádmio (Zirong e Shijun, 2007) e a compostos perfluorados (Liu et al., 2007); curimatá *Prochilodus lineatus* a herbicida atrazina (Santos, 2010), e lambari *Astyanax altiparanae* a inseticida imidacloprido (Almeida, 2016). Dados que corroboram com os resultados aqui apresentados com relação aos efeitos dos xenobióticos em peixes.

Já Simonato (2010), expondo *P. lineatus* à fração solúvel da gasolina em água, relatou aumento dos níveis GSH do fígado; e Elnwishy et al. (2007) relataram uma redução significativa, com posterior aumento de GSH total no fígado de tilápia *O. niloticus* expostas ao inseticida Diazinon. Provavelmente, a redução pode estar relacionada com tentativas imediatas do fígado de desintoxicar o organismo frente à ação do xenobiótico, e o aumento, posteriormente, indica uma adaptação às condições do ambiente. Fato que destaca o aumento da proteção do organismo contra o estresse oxidativo.

Uma vez que a GSH é um importante mecanismo de defesa antioxidante, sua depleção celular, como observada neste trabalho, pode produzir um estado pró-oxidante intracelular (Lenártová et al., 1997). Assim, pode-se inferir que a eteramina foi capaz de ativar o sistema de defesa antioxidante das tilápias, pois, os resultados de MetHb aumentando e o de GSH regredindo, coincidem com o fato de que a conversão de Hb à MetHb dependeria da avaria do sistema antioxidante e hemólise.

3.5. Biomarcadores morfológicos

No presente estudo, a histopatologia foi utilizada como ferramenta de detecção de respostas dos peixes frente à exposição à eteramina. Lesões celulares podem ser causadas pela exposição a agentes tóxicos, sendo que a gravidade da lesão dependerá da intensidade, duração e qual o órgão acometido, podendo, se cessado a ação do tóxico, o órgão acometido voltar a homeostasia (Brasileiro-Filho, 2009). Segundo Hibiya (1982), o contato com algum composto tóxico pode desencadear processos degenerativos e necróticos, transtornos de crescimento celular como hiperplasia e hipertrofia, além de distúrbios circulatórios. O dano causado ao organismo, devido a essas alterações morfológicas sofridas, pode ser expresso pelo Índice de órgão (I_{org}) (Tab. 4).

Tabela 4. Índices de órgão (I_{org}) branquial e hepático estimados da exposição à eteramina de juvenis de tilápia (*O. niloticus*)

Eteramina mg/L	Índice de órgão - I_{org}	
	Branquia	Fígado
Controle (0)	5,2 ± 1,64 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
0,4	19,0 ± 1,41 ^b	5,8 ± 0,45 ^b
0,8	19,6 ± 1,14 ^b	6,0 ± 1,22 ^b
1,6	28,4 ± 1,95 ^c	4,2 ± 0,45 ^b
3,2	32,2 ± 1,64 ^c	10,4 ± 1,82 ^c
6,4	32,4 ± 2,06 ^c	16,2 ± 1,79 ^d

Diferentes letras na mesma coluna demonstram diferenças significativas pelo teste de Bonferroni ($P < 0,01$).

Tanto o I_{org} branquial, quanto o I_{org} hepático, aumentaram significativamente quando os animais foram expostos a concentrações a partir de 0,4 mg/L de eteramina, sendo que a partir de 1,6 mg/L, para as brânquias, e 3,2 mg/L, para o fígado, as alterações foram intensificadas. No presente estudo, as análises indicaram que a exposição à eteramina induz a ocorrência de alterações branquiais e hepáticas.

Santos-Silva et al. (2017) trabalhando com pacamãs expostos a NH_3 e NO_2^- , avaliando as brânquias, obtiveram um I_{org} de 20, para concentração de 10,76 mg/L NH_3 , e I_{org} de 18, para

233,49 mg/L NO₂⁻, respectivamente. O que sugere que a eteramina causou mais lesões, em menores concentrações, se comparada com esse estudo. O uso de indicadores quantitativos histopatológicos em estudos toxicológicos com peixes ainda é escasso na literatura científica. Encontram-se, frequentemente, descrições qualitativas das lesões encontradas, o que gera uma interpretação incompleta do grau de acometimento dos organismos submetidos à exposição aos xenobióticos.

Com relação à atuação da eteramina sobre o sistema biológico dos peixes, a brânquia é o primeiro órgão a sofrer os impactos da exposição. Sua superfície está permanentemente em contato com ambiente externo (Hinton e Laurén, 1990), apresentando uma alta taxa de perfusão (Heath, 1987) o que facilita o acesso do xenobiótico ao meio interno do organismo, propiciando alterações fisiológicas.

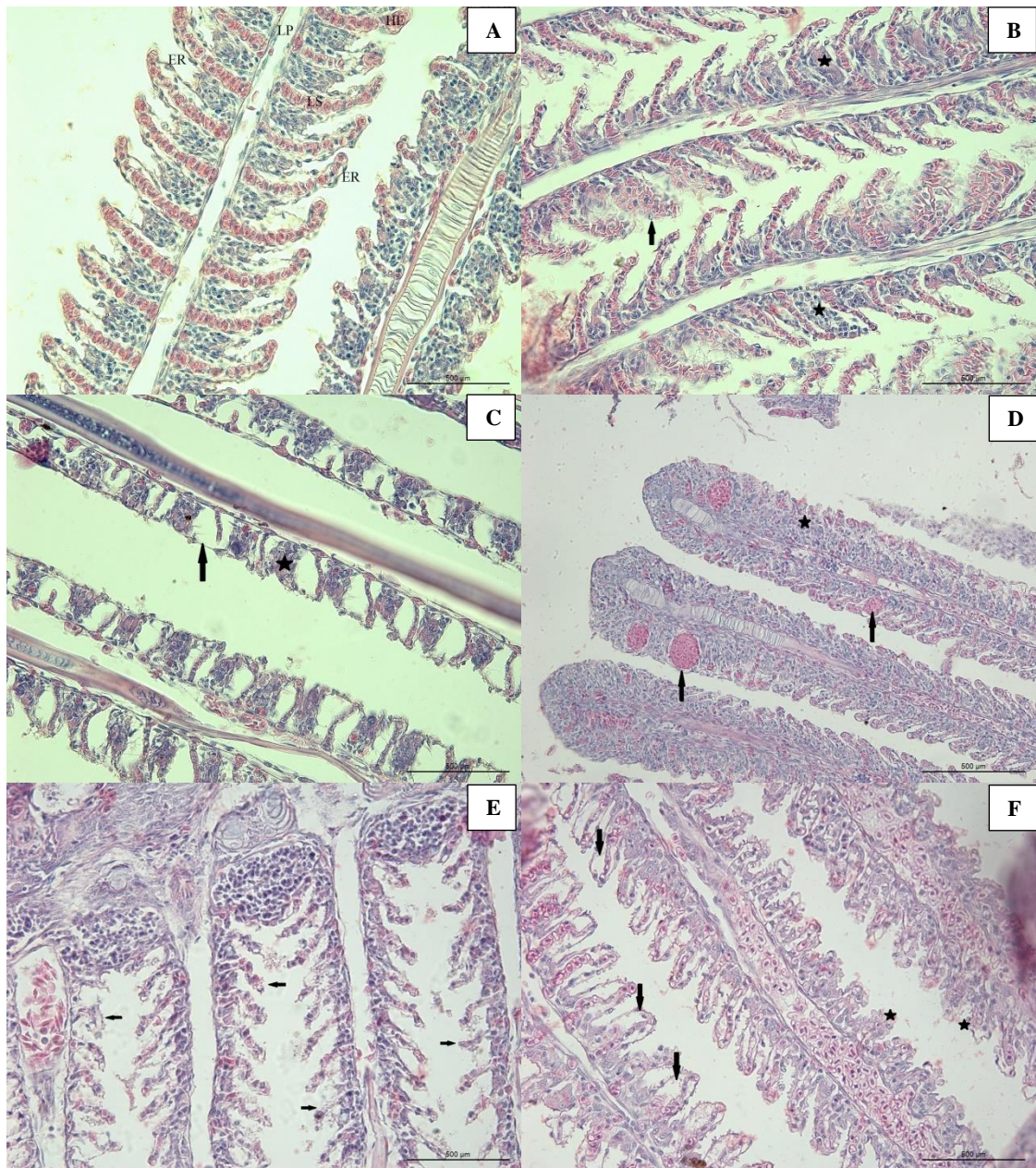
A brânquia é um órgão multifuncional essencial para organismos aquáticos e esta envolvida nas trocas gasosas, osmorregulação, ionorregulação e excreção (Perry, 1997; Au, 2004). Além disso, sua suscetibilidade ao aparecimento de lesões após exposição a produtos químicos na água, a torna um importante biomarcador histopatológico (Bernet et al., 1999; Au, 2004).

Não existem estudos histopatológicos relatados sobre a ação das eteraminas nos tecidos de peixes. No entanto, no presente estudo foi observado que a eteramina causou alterações morfológicas nas brânquias (Fig. 8). As brânquias no grupo controle apresentaram hiperplasia leve e desprendimento do epitélio respiratório (Fig. 8A). Essas alterações são comuns em indivíduos jovens, e pelas brânquias estarem em contato direto com a água, pequenas alterações eram esperadas.

Já nos animais expostos a eteramina, as alterações histopatológicas observadas foram: aneurisma, hiperplasia, hipertrofia, desprendimento do epitélio respiratório, hiperemia e necrose. Entretanto, essas alterações foram mais frequentes, com a intensidade de moderada a severa, nas maiores concentrações (Fig. 8B-F). O aumento de secreção de muco, juntamente com as alterações observadas no presente estudo, foi relatado após a exposição de peixes a pesticidas, fenóis e metais pesados (Nowak et al., 1992).

O desprendimento do epitélio respiratório é uma reação inicial das brânquias quando o peixe está exposto a algum agente estressor (Winkaler et al., 2001), tendo como finalidade reduzir a funcionalidade do órgão atingido (Bernet et al., 1999), em uma possível tentativa de diminuir a contaminação pela substância tóxica.

Figura 8. Fotomicrografias mostrando tecido branquial de juvenis de tilápia *O. niloticus* expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A - grupo controle, epitélio de revestimento (ER), lamela primária (LP), lamela secundária (LS) e hemácias (HE) (400x); B - 0,4 mg/L de eteramina, hiperplasia epitelial (estrela) e congestão (seta) (400x); C - 0,8 mg/L de eteramina, desprendimento epitelial (seta) e hiperplasia epitelial (estrela) (400x); D - 1,2 mg/L de eteramina, fusão lamelar (estrela) e aneurisma (seta) (200x); E - 3,2 mg/L de eteramina, necrose (setas) (400x); F - 6,4 mg/L de eteramina, desprendimento epitelial (setas) e alteração estrutural (estrelas) (400x). Coloração HE



Thomson (1978) destaca que a hiperplasia é o aumento da proliferação celular, em virtude de uma elevação na atividade mitótica podendo levar a fusão lamelar. Pode ser induzida por um aumento funcional do órgão ou por irritação química (Mumford et al., 2007), originando-se a partir dos mecanismos de defesa. Sendo uma das primeiras alterações histopatológicas nas brânquias de tilápias do Nilo, expostas à amônia (Benlí e Köksal, 2005).

A hiperplasia reduz o espaço interlamelar, podendo causar uma fusão lamelar parcial ou completa, reduzindo a superfície para absorção de xenobióticos presente (Bernet et al., 1999; Robbins e Cotran, 2005; Koca et al., 2005; Camargo e Martinez, 2007). Essas alterações aumentam a distância entre a água e o sangue, em virtude da redução ou cessação da passagem da água entre as lamelas secundárias hiperplásicas (Lupi et al., 2007), criando uma barreira, mas que juntamente com o desprendimento epitelial e aumento da secreção de muco, reduzem as trocas gasosas, podendo levar a ruptura de vasos sanguíneos, hemorragia (Nowak et al., 1992; Thophon et al., 2003), e hipóxia (Mallatt, 1985; Camargo e Martinez, 2007), se o agente tóxico não for removido. A fusão lamelar encontrada em todos os grupos expostos neste experimento evidencia uma tentativa do organismo de evitar a maior absorção de xenobióticos pelas brânquias.

A hipertrofia, por sua vez, é o aumento quantitativo dos constituintes e das funções celulares, resultando no aumento volumétrico das células (Brasileiro-Filho, 2009), sendo um tipo de alteração progressiva, que leva a um acréscimo da atividade das células ou tecidos (Bernet et al., 1999). Os aneurismas podem resultar de reações inflamatórias ou distúrbios circulatórios, devido a obstruções do fluxo sanguíneo, ocasionadas por fenômenos hiperplásicos (Hinton e Laurén, 1990). Além disso, podem causar intensa vasodilatação com deslocamento do epitélio lamelar, com possibilidade de ruptura (Fernandes e Mazon, 2003), e consequente hemorragia. Os aneurismas foram pouco numerosos nas brânquias amostradas no estudo, aparecendo somente nos grupos 3,2 e 6,4 mg/L de eteramina. É uma alteração tecidual que pode ser observada frequentemente em espécies capturadas em áreas contaminadas (Stentiford et al., 2003), e em contato com contaminantes químicos (Santos, 2010) e metais pesados (Garcia-Santos, 2007).

Segundo Winkaler et al. (2001), esses tipos de lesões histopatológicas indicam que os peixes respondem aos efeitos dos agentes tóxicos presentes na água. As alterações encontradas no presente estudo são similares com as descritas em outras pesquisas envolvendo respostas biológicas de peixes frente a intoxicações. As lesões mais frequentes nas pesquisas ecotoxicológicas são: hiperplasias, hipertrofias, aneurismas, desprendimento epitelial, necrose e fusão lamelar, em *Salmo clarki* (truta) (Thurston et al., 1978), pacamãs

(Cardoso et al., 1996) e *Cyprinus carpio* (carpa comum) (Kadhim e Al-Faragi, 2018) expostos a amônia não ionizada; e robalo asiático (*Lates calcarifer*) exposto a cádmio (Thophon et al., 2003). Usando a mesma espécie do presente estudo, a exposição ao herbicida glifosato (Jiraungkoorskul et al., 2002) e a amônia não ionizada (El-Shebly e Gad, 2011) também foram capazes de causar as mesmas lesões anteriormente citadas.

Essas lesões implicam comprometimento de funções respiratórias e osmoregulatórias após exposição continuada, demonstrando que diferentes compostos químicos podem causar alterações branquiais similares. As alterações histopatológicas de brânquias são, em geral, responsivas, mas não específicas à exposição a poluentes (Au, 2004).

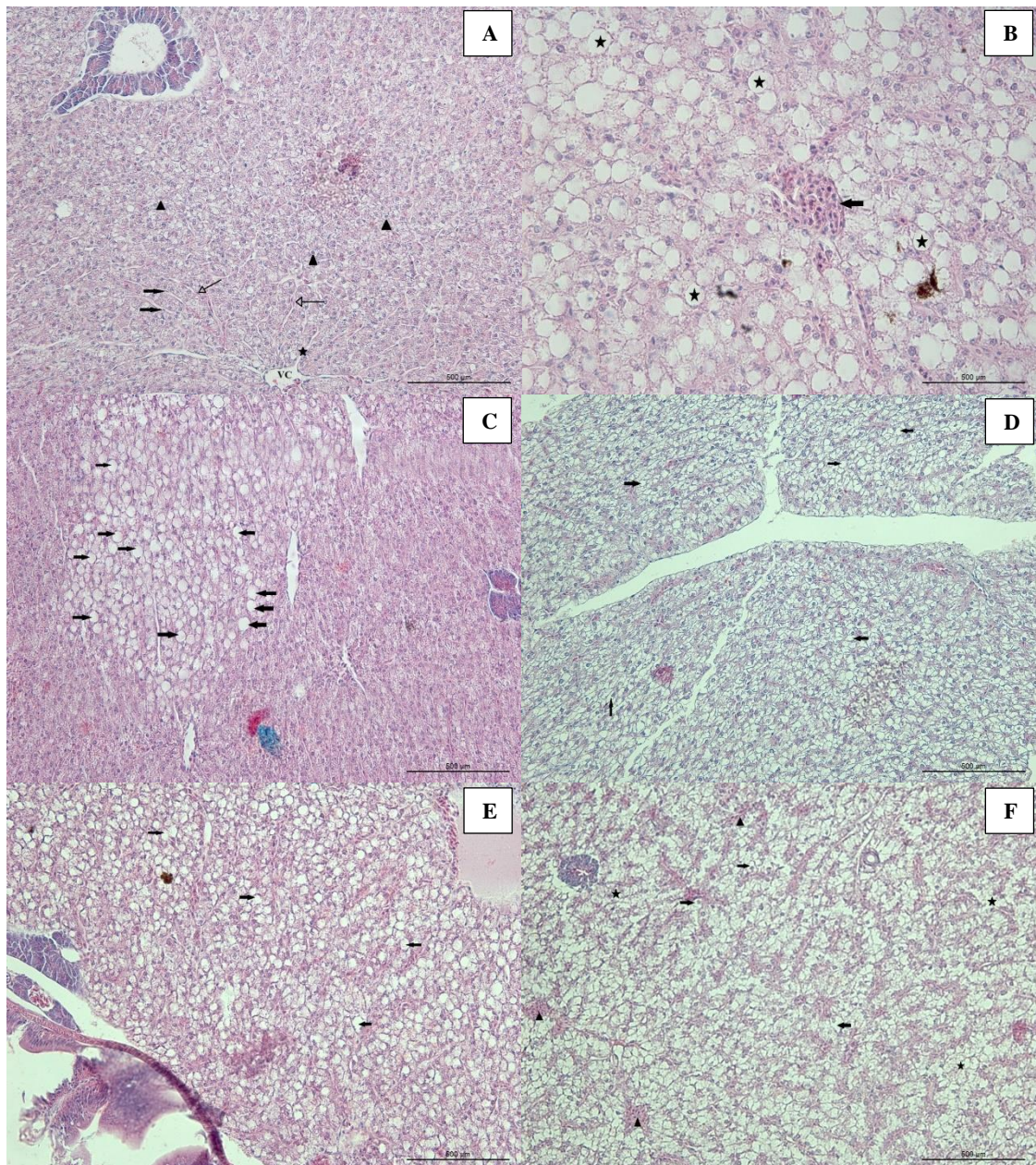
De acordo com Brasileiro-Filho (2009), depois de cessada a ação do agente agressor, a célula poderá voltar ao seu estado de homeostase dependendo da qualidade, intensidade e duração da agressão, bem como do estado funcional ou tipo celular comprometido. Quando um composto tóxico não causa mortalidade em massa de organismos aquáticos, podem-se observar severas alterações histopatológicas nos órgãos acometidos, como em brânquias e fígado.

Como referido anteriormente, não existem estudos histopatológicos relatados sobre a ação das eteraminas nos tecidos de peixes. No entanto, este estudo mostrou sua capacidade de causar alterações morfológicas no fígado (Fig. 9). O fígado é um órgão de intensa atividade metabólica, que desempenha papel fundamental no metabolismo e excreção de xenobiontes, sendo, portanto, essencial na manutenção da homeostase metabólica do animal (Hinton e Laurén, 1990; Bernet et al., 1999; Roberts, 2001). É composto de hepatócitos entre os quais há células epiteliais dos ductos biliares, células de Kupffer (macrófagos), células sanguíneas e endoteliais (Takashima e Hibiya, 1995), e sinusóides (Rajeshkumar et al., 2013).

Por ser o principal local de detoxificação em peixes, na presença de substâncias químicas, o fígado pode desenvolver alterações morfológicas nos hepatócitos (Hinton e Laurén, 1990; Takashima e Hibiya, 1995; Thophon et al., 2003; Honorato et al., 2014), sendo por isso considerado um ótimo biomarcador para monitoramento de poluição dos recursos hídricos (Zelikoff, 1998; Rajeshkumar et al., 2013).

O processo de detoxificação requer uma série de reações que envolvem antioxidantes (Ferreira e Matsubara, 1997), produzindo metabólitos hidrofílicos, que sejam mais facilmente excretados (Hodgson e Goldstein, 2001), e impedindo danos oxidativos a componentes celulares (Van Der Oost et al., 2003). Porém, se o xenobiótico atuar em condições acima do que esse sistema de defesa consegue combater, alterações histopatológicas podem surgir no tecido.

Figura 9. Fotomicrografias mostrando o parênquima hepático de juvenis de tilápia *O. niloticus* expostos a concentrações agudas de eteramina por 96 h, onde se observa: A - grupo controle, tecido pancreático difuso, hepatócitos poligonais arranjados em cordões (cabeças das setas), hemácias (flechas), células de Kupffer (setas), sinusóides (estrelas) e veia central (vc) (200x); B - 0,4 mg/L de eteramina, vacúolos citoplasmáticos e degeneração nuclear (estrelas) e congestão (setas) (400x); C - 0,8 mg/L de eteramina, hepatócitos com vacuolização difusa no citoplasma e degeneração nuclear (setas) (100x); D - 1,2 mg/L e E - 3,2 mg/L de eteramina, vacuolização difusa do parênquima hepático (setas) (200x); F - 6,4 mg/L de eteramina, vacuolização difusa do parênquima hepático (setas), necrose (estrelas) e congestão (cabeças das setas) (200x). Coloração HE



Secções através do fígado dos peixes do grupo controle exibiram uma arquitetura parenquimatosa normal, com hepatócitos poligonais em arranjo cordonal, que continham citoplasma homogêneo com núcleo centralizado, vasos sinusóides e células de Kupffer, além de um tecido pancreático difuso (Fig. 9A). Os resultados conferem com a descrição histológica de Santos et al. (2004) e Gayão et al. (2013), para tilápia nilótica, o que permitiu caracterizar a histologia do fígado do grupo controle como padrão estrutural para a espécie. As alterações histopatológicas observadas nos peixes expostos a eteramina foram: dilatação dos sinusóides, vacuolização dos hepatócitos, degeneração celular e nuclear, congestão sanguínea e necrose (Fig. 9B-F).

A exposição a locais contaminados também provoca alterações histopatológicas nos órgãos de peixes. Utilizando o fígado para biomonitoramento ambiental, elencam-se alguns estudos histopatológicos de diferentes xenobióticos. Entre as alterações hepáticas comumente observadas nesses estudos, destacam-se: hipertrofia e vacuolização dos hepatócitos, degeneração citoplasmática e nuclear, necrose, centros melanomacrófagos, congestão, proliferação de fibroblastos e esteatose. Essas alterações foram sinalizadas em curimatás *P. lineatus* de ribeirão urbano (Camargo e Martinez, 2007); em lambaris *Astyanax jacuhiensi* de lagoas de estabilização petroquímica (Flores-Lopes e Malabarba, 2007); em dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* de baía contaminada (Rocha et al., 2010); em milkfish *Chanos chanos* de área contaminada com metais pesados (Rajeshkumar et al., 2013); e em tambaquis *C. macropomum* proveniente de área de mineração (Pinheiro et al., 2017).

A hipertrofia celular ou nuclear, alteração comum nos estudos de biomonitoramento ambiental, indica o aumento da atividade da célula na presença ou ausência de alguma substância (Hinton et al., 1992; Takashima e Hibiya, 1995), podendo resultar em necrose (Takashima e Hibiya, 1995). No presente estudo, o fígado apresentou congestão multifocal dos sinusóides, caracterizada pela presença de células sanguíneas (Hibiya, 1982), hepatócitos em desarranjo cordonal, e deslocamento de núcleo dos hepatócitos. Alterações presentes a partir da concentração de 0,4 mg/L de eteramina (Fig. 9B).

Diferenças no formato e tamanho dos hepatócitos, assim como no núcleo, estão associadas a patologias e a atividade metabólica do fígado (Rašković et al., 2011). Segundo Gayão et al. (2013), com o aumento de volume dos hepatócitos ocorre a descentralização do núcleo e a vacuolização no citoplasma, alterações presentes no estudo, o que é indicativo de atividade metabólica alterada.

Essa vacuolização sugere a existência de regiões com concentrações de lipídeos e glicogênio, ou a combinação de agentes tóxicos com lipídeos citoplasmáticos (Santos et al., 2004). O acúmulo de lipídeos no hepatócito, denominado esteatose hepática (Hibiya, 1982), pode ser consequência de distúrbios metabólicos ou uma alteração parcial na sua morfologia (Kendall, 1977), causados por exposição a produtos tóxicos, e normalmente antecedendo a necrose (Robbins e Cotran, 2005). A presença atípica de lipídeos e glicogênio no citoplasma prejudica as atividades metabólicas (Santos et al., 2004; Gayão et al., 2013). Já a degeneração hidrópica e a tumefação turva, são caracterizadas pelo aumento do volume da célula, em diferentes proporções, devido ao acúmulo de água e eletrólitos em seu interior (Robbins et al., 1989). Para a determinação de qual metabólito presente no parênquima hepático, devido ao aparecimento de vacuolização difusa com as crescentes concentrações, são necessários métodos histológicos específicos para manutenção da integridade dessas inclusões, sem utilizar substâncias que solubilizem esses metabólitos (Rodrigues e Fanta, 1998; Santos et al., 2004).

Rocha et al. (2010) destacam que a biotransformação de xenobióticos pode ocasionar na produção de EROS, que podem levar a lesão peroxidativa dos lipídios da membrana, e consequentemente a necrose. Como a necrose somente foi observada nas concentrações de 3,2 e 6,4 mg/L de eteramina, isso pode indicar uma pressão exercida do tóxico sobre o sistema de detoxificação, onde o mesmo não foi suficiente para concluir o processo e retornar a homeostase, devido as alterações observadas nas maiores concentrações e a mortalidade.

Essas alterações são consistentes com as relatadas em fígado da mesma espécie do estudo. A exposição de tilápias ao herbicida glifosato causou vacuolização, dilatação de sinusóides e picnose nuclear (Jiraungkoorskul et al., 2002), o cobre causou vacuolização e necrose (Figueiredo-Fernandes et al., 2007), e o tetracloreto de carbono (CCl₄) resultou em esteatose (Moraes et al., 2018). O fígado recebe por via sanguínea os poluentes absorvidos do ambiente podendo conforme tempo de exposição, tipo de substância e concentração, sofrer alterações morfológicas (Saleh, 1982; Braunbeck et al., 1990), como degeneração celular e nuclear, reduzindo áreas metabolicamente ativas (Hinton e Laurén, 1990; Hinton et al., 1992; Takashima e Hibiya, 1995).

Novamente, devido a possibilidade de conversão das eteraminas em compostos nitrogenados (Scorsafava et al., 2010), optou-se por comparar os resultados da eteramina encontrados com a amônia não ionizada, em razão do potencial de intoxicação para organismos aquáticos. Histopatologias como tumefação turva e degeneração hidrópica foram encontradas em juvenis de *O. niloticus* (65 g), em teste crônico de seis semanas com

concentrações de 0,14 mg/L N-NH₃ (Benli et al., 2008). Já a exposição de *R. quelen* a 3,82 mg/L N-NH₃ por 24 h causou dilatação dos sinusóides (Miron et al., 2008).

As análises realizadas no tecido hepático demonstraram que a substância testada afeta a morfologia e a concentração de metabólitos neste órgão, interferindo nas suas funções vitais. Considerando que as alterações observadas no tecido hepático das tilápias são semelhantes às aquelas verificadas por outros pesquisadores com diferentes agentes tóxicos, é possível concluir que a eteramina apresenta uma intensa ação hepatotóxica. Rodrigues e Fanta (1998) sugerem que há uma sequência temporal de acometimento após exposição a agentes tóxicos, onde coincidiram muitas alterações observadas no presente estudo. A sequência começa com a descentralização nuclear dos hepatócitos e granulação de seu citoplasma, seguida por vacuolização, tumefação turva, intensa pigmentação nuclear, necrose, invasão de macrófagos e inchaço dos canalículos.

O comprometimento do fígado pode interferir na detoxificação dos compostos nitrogenados (Santos-Silva et al., 2017), o que pode justificar a mortalidade nas concentrações maiores de eteramina. Todas as alterações histopatológicas citadas reforçam que as lesões observadas no presente estudo não são causadas exclusivamente por eteramina. No entanto, pode-se basear seu potencial tóxico com essas substâncias igualmente poluidoras. As alterações morfológicas do fígado são resultados de um mecanismo defensivo ou de alterações adaptativas a contaminação (Au, 2004). O que sugere a possibilidade de uso como bioindicador para a eteramina presente no meio ambiente.

4.CONCLUSÃO

A tilápia do Nilo (*O. niloticus*), mostrou-se susceptível à exposição aguda de eteramina, sendo evidente pela análise dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos. O nível de segurança encontrado no presente trabalho auxilia na compreensão da atividade da eteramina em um sistema biológico, porém, não deve ser utilizada para peixes em geral.

A eteramina age como um agente estressor, que reduz os níveis de Hb e GSH, induz a formação de MetHb, causando ainda um aumento da FV em tilápia. O estudo histopatológico mostrou os principais efeitos causados nas brânquias e fígado, corroborando o que é colocado pela literatura no que diz respeito aos cuidados que devem ser tomados com poluentes no ambiente aquático.

5.AGRADECIMENTOS

Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária – LAQUA/UFMG, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

6.REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro, 2016.
- AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F. et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v.133, p.375-382, 2002.
- ALMEIDA, E.C. *Efeitos bioquímicos e genotóxicos do inseticida imidacloprido para *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae)*. 2016. 80f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; DUNCAN, W.P.; VAL, A.L. Crude oil effects on fish of the Amazon: current status. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE BIOLOGY OF FISH, 2002, Vancouver, BC, Canada. *Proceedings of the International Congress on the Biology of Fish*. Vancouver, BC, Canada. 2002. v.1, p.49-59. (News and Reviews).
- ALVARENGA, C.M.D.; VOLPATO, G.L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiol. Behav.*, v.57, n.1, p.75-80, 1995.
- APHA - Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th. Washington, DC: APHA, 1992.
- ARAÚJO, D.M.; YOSHIDA, M.I.; TAKAHASHI, J.A. et al. Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, v.64, n.2, p.151-155, 2010.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, v.48, p. 817-834, 2004.
- BARRETO, R.E.; VOLPATO, G.L. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behav. Processes.*, v.66, n.1, p.43-51, 2004.
- BARRETO, R.E.; VOLPATO, G.L. Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. *J. Exp. Anim. Sci.*, v.43, p.189-196, 2006.
- BATISTELLI, G.M.B.; PERES, A.E.C. Residual amine in iron ore flotation. *Miner. Eng.*, v.21, p.873-876, 2008.
- BENLÍ, A.Ç.K.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, n.2, p.339-344, 2005.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for determination of glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, v.61, p.882-890, 1963.
- BRASIL. Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. Brasília: DNPM, 2017.
- BRASILEIRO-FILHO, G. BOGLIOLO: Patologia Geral. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BRAUNBECK, J.B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.19, p.405-418, 1990.

- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, v.5, n.3, p.327-336, 2007.
- CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *J. Fish Biol.*, v.49, p.778-787, 1996.
- CLARIANT, FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos em acordo com a NBR-14725 Flotigam EDA 3, 2009a. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- _____. FLOTIGAM EDA 3C, 2009b. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- _____. FLOTIGAM 2835-2, 2009c. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- _____. FLOTIGAM EDA C, 2014. Disponível em: < <http://www.clariquimica.com.br>>. Acessado em: 27 dez. 2018.
- COLLING, A.V.; RIZZO, A.C.L. Biodegradação de aminas: recuperação ambiental e viabilidade econômica do processo. In: Série Tecnologia Ambiental, 98. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2017. 53p.
- COPATTI, C.E.; BOLNER, K.C.S.; DE ROSSO, F.L. et al. Tolerance of piava juveniles to different ammonia concentrations. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.6, p.3991-4002, 2015.
- COSTA, O.T.F.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, v.232, p.627-636, 2004.
- DAS, P.C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J.K.; DAS, B.K. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.): acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters. *Aquaculture*, v.235, p.633-644, 2004.
- EL-SHEBLY, A.A.; GAD, H.A.M. Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Microbiol. Biotech. Res.*, v.1, n.4, p.183-197, 2011.
- ELLIS, A.E. Bizarre forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Dis.*, v.7, p.411-414, 1984.
- ELNWISHY, N.H.; AHMED, M.T.; EL-SHERIF, M.A.; EL-HAMEED, M.A. The effect of diazinon on glutathione and acetylcholinesterase in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Agri. Soc. Sci.*, v.3, n.2, 2007.
- EMMANOUIL, C.; GREEN, R.M.; WILLEY, F.R.; CHIPMAN, J.K. Oxidative damage in gill of *Mytilus edulis* from Merseyside, UK, and reversibility after depuration. *Environ. Pollut.*, v.151, n.3, p.663-668, 2008.
- FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A.L.; KAPOOR, B.G. (Eds.). Fish Adaptations. Enfield, USA, p.203-231, 2003.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; GARCIA-SANTOS, S. et al. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis* exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.3, p.103-109, 2007.

- FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. *Biociências*, v.15, n.2, p.166-172, 2007.
- GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápias nilóticas *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.376-381, 2007.
- GAYÃO, A.L.B.A.; BUZOLLO, H.; FÁVERO, G.C. et al. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.48, n.8, p.991-997, 2013.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.12, p.714-719, 1977.
- HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. CRC Press, Inc., Florida, 1987.
- HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. New York: Kodansha Tokio, 1982.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R. et al. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds) Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p.155-196.
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Chelsea, USA, 1990.
- HODGSON, E.; GOLDSTEIN, J.A. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (Eds). Introduction to biochemical toxicology. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2001. p.67-113.
- HONORATO, C.A.; da CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J. et al. Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, p.64-68, 2014.
- IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. IBAMA. Minas Gerais, 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf. Acessado em: 07 set. 2017.
- IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. Dados sobre Brasil e Estado de Minas Gerais. 2018b. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/dados-e-leis/dados/>. Acessado em: 13 jan. 2019.
- ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, C.M. Hematological parameters in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazi. Arch. Biol. Technol.*, v.50, n.4, p.619-626, 2007.
- JEE, J.H.; KIM, S.G.; KANG, J.C. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.304 p.123-136, 2004.

- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAMA, E.S.; KRUATRACHUEA, M., et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, v.28, n.2, p.121-127, 2002.
- KADHIM, M.A.; AL-FARAGI, J.K. Effect of adding sodium chloride in water on mortality rate, behavior and gill histopathology in *Cyprinus carpio* exposed to acute toxicity of unionized ammonia. *J. Entomol Zool Stud.*, v.6, n.2, p.721-726, 2018.
- KENDALL, M.W. Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.18, p.143-15, 1977.
- KOCA, Y.B.; KOCA, M.; YILDIZ, S. et al. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. *Environ. Toxicol.*, v.20, p.560-571, 2005.
- KORMANIK, G.A.; CAMERON, J.N. Ammonia excretion in animals that breath water: A review. *Mar. Biol. Lett.*, v.2, p.11-23, 1981.
- KOSAKA, H.; TYUMA, I. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhaemoglobin by nitrite. *Environ. Health Perspec.*, v.73, p.147-151, 1987.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. Tilápias: qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade - Parte 1. *Panorama da Aquicultura*, v.10, n.59, p.44-53, 2000.
- LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Eds.) Fish ecotoxicology. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, 1998. p.203-224.
- LENÁRTOVÁ, V.; HOLOVSKÁ, K.; PEDRAJAS, J.R. et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, v.2, p.247-252, 1997.
- LIMA, P.L.; BENASSI, J.C.; PEDROSA, R.C. et al. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.50, p.23-30, 2006.
- LIU, C.; YU, K.; SHI, X. et al. Indução de estresse oxidativo e apoptose por PFOS e PFOA em hepatócitos de cultura primária de tilápia de água doce (*Oreochromis niloticus*). *Aquat Toxicol.*, v.82, n.2, p.135-43, 2007.
- LUNA, L.G. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York, Mc-Graw Hill, 1968.
- LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. *Rev. Fafibe* (online), n.3, 2007.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *J. Fisheries Aquatic Sci.*, v.42, p.630-648, 1985.
- MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá: ABRAPOA, 2006. p.43-62.
- MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. (Org.). Tópicos Especiais

- em Biologia Aquática e Aquicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - Aquabio, 2006. p.81-95.
- MIRON, D.S.; MORAES, B.; BECKER, A.G. et al. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*, v.277, p.192-196, 2008.
- MORAES, A.C.; PRADO, E.J.R.; FOZ, E.P. et al. Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa. *Pesq. Vet. Bras.*, v.38, n.8, p.1570-1576, 2018.
- MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C. et al. Fish histology and histopathology. v.4, 2007. Disponível em: <https://nctc.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/Fish_Histology_Manual_v4.pdf>. Acessado em: 12 nov. 2018.
- NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagentes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n.1, p. 19-22, 2004.
- NONNOTTE, G.; MAXIME, V.; TRUCHOT, J.P. et al. Respiratory responses to progressive ambient hypoxia in the sturgeon, *Acipenser baeri*. *Respir. Physiol.*, v.91, p.71-82, 1993.
- NOWAK, B.F.; DEAVIN, F.G.; SARJITO-MUNDAY, B.L. Scanning electron microscopy in aquatic toxicology. *J. Comput. Assist. Microsc.*, v.4, p.241-246, 1992.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. 1992. 10p. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf>. Acesso em: 22 jan 2018.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Uso Clínico do Sangue. Genebra. p.1-372. 2013.
- PALACHEK, R.M.; TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth Bass (*Micropterus salmoides*): Evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.41, n.12, p.1739-1744, 1984.
- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água: Uma revisão. *B. Inst. Pesca*, v.31, n.1, p.81-88, 2005.
- PERRONE, S.J.; MEADE, P.L. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, v.34, p. 486-492, 1977.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. *Annual Rev. Physiol.*, v.59, p.325-347, 1997.
- PINHEIRO, K.B.S.; FERREIRA, R.L.S.; MOTA, J.B. et al. Histopatologia do fígado de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 proveniente de área sobre influência de mineração na Amazônia Oriental, Brasil. *Biota Amazônia*, v.7, n.3, p.74-78, 2017.
- QUEIROZ, J.F; BOEIRA, R.C. Boas Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aquicultura. Comunicado Técnico 44 – Embrapa, São Paulo. 2007. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/download/comunicado_44.pdf. Acesso: 28 dez. 2018.
- RAJESHKUMAR, S.; SUKUMAR, S.; MUNUSWAMY, N. Biomarkers of selected heavy metal toxicity and histology of *Chanos chanos* from Kaattuppalli Island, Chennai, southeast coast of India. *Environ. Earth Sci.*, v.72, n.1, p.207-219, 2013.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, A.F.; EIRAS, J.C. et al. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui

- (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, v.25, p.77-83, 1999.
- RAŠKOVIĆ, B.S.; STANKOVIĆ, M.B.; MARKOVIĆ, Z.Z.; POLEKSIĆ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J. Agricult. Sci.*, v.56, n.1, p.87-100, 2011.
- ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7.ed. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Eds). Elsevier/Medicina Nacionais, 2005.
- ROBERTS, R.J. Fish pathology. London: W.B. Saunders, 2001. 472p.
- ROCHA, R.M.; COELHO, R.P.; MONTES, C S. et al. A valiação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guajará, Belém, Pará. *Ci. Anim. Bras.*, v.11, n.1, p.101-109, 2010.
- ROSS, D. Glutathione, free-radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol. Therapeut.*, v.37, p.231-249, 1988.
- SALEH, H.H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. *Bull. Inst. Oceanogr. Fish.*, v.8, n.1, p. 69-79, 1982.
- SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, criadas em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo - Brasil. *Bol. Instit. Pesca*, v.30, p.141-145, 2004.
- SANTOS, T.G. Biomarcadores bioquímicos e genéticos para a detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SANTOS-SILVA, M.J. dos; COSTA, F.F.B.; LEME, F.P. et al. Biological responses of Neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *Sci. Total Environ.*, p.1-10, 2017.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. Animal Physiology: Adaptations and Environment. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 617p.
- SCORSAFAVA, M.A.; SOUZA, A.; STOFER, M. et al. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.69, n.2, p.229-232, 2010.
- SILVA, F.M.F. Quantificação de eteraminas em rejeitos da flotação de minério de ferro em função da granulometria. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- SIMONATO, J.D. Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus*. 2010. 71 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*, v.5, p.245-266, 1971.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. 1992. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.). Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p.235-335.

- STENTIFORD, G.D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B.P. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.*, v.55, n.2, p.137-159, 2003.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2.ed. Califórnia: Kodansha Limited, 1995. 195p.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C. et al. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Sci.*, v.24, n.2, p.547-554, 2002.
- TEODORO, A.L.; LEÃO, V.A. Recuperação de aminas, utilizadas na flotação de minério de ferro, utilizando-se zeólitas naturais. *REM: R. Esc. Minas*, v.57, n.3, p.197-201, 2004.
- THOMSON, R.G. Patologia geral veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, v.121, p.307-320, 2003.
- THURSTON, R.V.; RUSSO, R.C.; SMITH, C.E. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.107, n.2, p.361-368, 1978.
- USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. National Recommended Water Quality Criteria. 2002. Disponível em: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>. Acesso em: 01 jan. 2019
- _____. Ecological effects test guidelines 850-1075. Fish acute toxic test. 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.13, p.57-149, 2003.
- VIEIRA, F. Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. In: IEF-MG. MG. BIOTA. Belo Horizonte: Instituto Estadual de Florestas, v.2, n.5, 2010.
- VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and a general view about the causal mechanisms. *Bol. Fisiol. Anim.*, v.13, p.7-22, 1989.
- WANG, W.; WANG, H.; YU, C.; JIANG, Z. Acute toxicity of ammonia and nitrite to different ages of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae. *Chem. Speciation Bioavailability*, v.27, n.4, p.147-155, 2015.
- WILLIAMS, E.M.; EDDY, F.B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.*, v.156, p.867-872, 1986.
- WINKALER, E.U., SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, state of Paraná. *Acta Sci.*, v.23, n.2, 507-514, 2001.
- YANBO, W.; WENJU, Z.; WEIFEN, L. et al. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiol. Biochem.*, v.32, p.49-54, 2006.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology*, v.129, n.1, p.63-71, 1998.

ZIRONG, X.; SHIJUN, B. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.67, n.1, p.89-94, 2007.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como mencionado anteriormente, cada espécie apresenta uma suscetibilidade individual perante a ação de compostos tóxicos. Por este motivo, existe a necessidade de estudos toxicológicos com diferentes organismos testes para se entender o comportamento do xenobiótico, podendo prevenir e remediar ações em possíveis contatos com a substância. É de suma importância também, a exposição a concentrações subletais por mais tempo, para determinar os efeitos crônicos da etramina, representando quadros reais de exposição como o ocorrido no rio Doce.

Este tipo de estudo serve para alertar a comunidade científica do perigo que representa a etramina para os organismos aquáticos. Sendo importante o monitoramento desse poluente em recursos hídricos adjacentes as regiões de intensa atividade mineradora. Além disso, sob o ponto de vista ambiental (ecossistema mundial) e econômico (mineradoras), torna-se interessante o investimento em tecnologias de reaproveitamento da etramina no processo de beneficiamento do minério, além do processo otimizado de biodegradação, de modo a reduzir as concentrações da substância no rejeito.