



**UNILASALLE**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



FRANCINE BALBINOT ELISEU

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO  
BIOINDICADOR *DANIO RERIO* (ZEBRAFISH) EM ÁGUAS CONTENDO ÍONS  
XANTATO**

CANOAS, 2015

FRANCINE BALBINOT ELISEU

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO  
BIOINDICADOR *DANIO RERIO* (ZEBRAFISH) EM ÁGUAS CONTENDO ÍONS  
XANTATO**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra Marqueze

Coorientação: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cristiane Oliveira Rodrigues

CANOAS, 2015

FRANCINE BALBINOT ELISEU

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO  
BIOINDICADOR *DANIO RERIO* (ZEBRAFISH) EM ÁGUAS CONTENDO ÍONS  
XANTATO**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Aprovado pela banca examinadora em 27 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Marqueze

UNILASALLE

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana Calvete

UFRGS

---

Prof. Dr. Leonardo J. G. Barcellos

UPF

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Caroline Abrão Dalmaz

UNILASALLE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Francisco e Luiza pela compreensão, estímulo e ajuda.

Ao meu amado marido Leandro, pelas contribuições e, principalmente, pelo amor e compreensão durante este período.

Agradeço em especial a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Marqueze, pelo desafio, oportunidade, pela confiança depositada e por toda dedicação, orientação e amizade.

A minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Oliveira Rodrigues, pela orientação, ensinamento e sugestões.

As queridas bolsistas de iniciação científica Rosângela, Jéssica, Tássia e Michele, pelo apoio, auxílio e trabalho de equipe.

Aos amigos que fiz durante a realização deste trabalho, Simone e Marcelo, agradeço pelas contribuições, pela imensa ajuda e pelo tempo doado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro.

**“O importante é não parar de questionar.  
A curiosidade tem sua própria razão de existência.”**  
(Albert Einstein)

## RESUMO

A contaminação nos ambientes aquáticos, atualmente, é uma problemática mundial, pois são ambientes que compõem vários tipos de ecossistemas com interações altamente complexas e diversas. A exposição às águas contaminadas pode levar à mortalidade dos organismos, além de afetar as taxas de crescimento, reprodução e comportamento. Neste estudo foram investigados os efeitos ecotoxicológicos da exposição do *Danio rerio* (zebrafish) frente a diferentes concentrações de isopropil xantato de sódio, reagente de flotação utilizado na indústria de mineração, através da avaliação do efeito das alterações no metabolismo de carboidratos. Primeiramente, foram realizados ensaios de exposição aguda por um período de 48 horas, para estabelecer uma concentração média letal (CL50-48h) aos íons xantato, através da taxa de mortalidade. Ao término da exposição aguda os peixes sobreviventes foram retirados dos aquários e crioanestesiados para posterior análise bioquímica. Foram analisados os parâmetros bioquímicos, como glicogênio, glicose e lactato. Adicionalmente, foi avaliada a estabilidade dos íons xantato nas condições estudadas, através do monitoramento da água. O resultado estimado para o valor da (CL50-48h) do reagente isopropil xantato de sódio para o *D.rerio* foi de 23 mg L<sup>-1</sup>. Para as análises bioquímicas os resultados encontrados mostram que não foram observadas alterações significativas nas reservas de glicogênio, apenas na concentração de 16 mg L<sup>-1</sup> teve um aumento significativo ( $\pm 348\%$ ), quando comparado ao grupo controle (CTR). Os níveis de glicose demonstraram um aumento significativo apenas nos grupos de 16 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 234\%$ ) e de 23 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 162\%$ ) e no lactato foi observado um aumento significativo nas concentrações de 13 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 279\%$ ), 16 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 284\%$ ) e 18 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 268$ ), contudo houve uma redução significativa ( $\pm 69\%$ ) na concentração de 4,5 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados ao grupo CTR. Os resultados obtidos no monitoramento da qualidade da água demonstraram que o isopropil xantato de sódio se manteve estável e que não houve interferência nos parâmetros da água, assegurando as condições de sobrevivência aos peixes. Frente aos resultados encontrados neste estudo pode-se constatar que através das alterações observadas nos diferentes parâmetros analisados o reagente isopropil xantato de sódio altera o metabolismo de carboidratos no *D.rerio*.

Palavras-chave: isopropil xantato de sódio, CL50, *Danio rerio*, metabolismo.

## ABSTRACT

The contamination in aquatic environments is currently a world problem, as they are environments that make up various types of ecosystems with highly complex and diverse interactions. Exposure to contaminated water can lead to mortality of organisms, and affect growth rates, reproduction and behavior. We have investigated the ecotoxicological effects of exposure *Danio rerio* (zebrafish) with different concentrations of sodium isopropyl xanthate, flotation reagent used in the mining industry, by evaluating the effect of changes in carbohydrate metabolism. First, tests were performed acute exposure for a period of 48 hours, to establish a mean lethal concentration (LC50-48h) to xanthate ion, by the mortality rate. At the end of acute exposure surviving fish were removed from the tanks and create anesthetized for further biochemical analysis. Biochemical parameters, as glycogen, glucose and lactate were analyzed. Additionally, the stability of xanthate ions in conditions was evaluated by monitoring the water. The result obtained for the value of (LC50-48h) of sodium isopropyl xanthate reagent for the *D.rerio* was 23 mg L<sup>-1</sup>. For biochemical analyzes, the results show that significant changes were observed in the glycogen content, only in the concentration of 16 mg L<sup>-1</sup> increased significantly ( $\pm 348\%$ ), when compared to the control group (CTR). Glucose levels showed a significant increase in groups of 16 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 234\%$ ) and 23 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 162\%$ ) and the lactate was observed a significant increase in the concentration of 13 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 279\%$ ), 16 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 284\%$ ) and 18 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 268\%$ ), but there was a significant reduction ( $\pm 69\%$ ) at a concentration of 4,5 mg L<sup>-1</sup>, when compared with CTR group. The results obtained in the monitoring of water quality showed that sodium isopropyl xanthate was stable and there was no interference from water parameters, ensuring the survival conditions for fish. Based on the results found in this study it can be seen that through the changes observed in different parameter settings analyzed, sodium isopropyl xanthate reagent alters carbohydrate metabolism in *D.rerio*.

Keywords: sodium isopropyl xanthate, LC50, *Danio rerio*, metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo de flotação .....	17
Figura 2 - Espuma formada no processo de flotação ... ..	18
Figura 3 - Estrutura química do isopropil xantato de sódio .....	19
Figura 4 - <i>Danio rerio</i> (Hamilton-Buchanan, 1822) .....	25
Figura 5 - Esquema representativo da Glicólise .....	29
Figura 6 - Representação esquemática das unidades utilizadas no teste de toxicidade .....	34

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Reservas de glicogênio para <i>Danio rerio</i> exposto ao isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações.....	40
Gráfico 2 - Níveis de glicose para <i>Danio rerio</i> exposto ao isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações.....	42
Gráfico 3 - Níveis de lactato para <i>Danio rerio</i> exposto aos íons xantato em diferentes concentrações.....	43
Gráfico 4 - Parâmetros bioquímicos do grupo jejum comparados ao grupo controle .....	45
Gráfico 5 - Curva de calibração isopropil xantato de sódio .....	49
Gráfico 6 - Concentração de íons xantato em função do tempo dos estudos .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos .....	47
Tabela 2 - Parâmetros de qualidade da água em função da concentração de íons xantato .....	48
Tabela 3 - Concentrações dos íons xantato nominais e aferidas no estudo .....	50

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise da Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
CL50	Concentração letal mediana (real – 50% dos organismos)
CL(I)50	Concentração letal inicial mediana (nominal – 50% dos organismos)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul
DL50	Dose letal de 50% da população
IC	Intervalo de confiança
NBR	Norma Brasileira
OD	Oxigênio dissolvido
UPF	Universidade de Passo Fundo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>3.1</b>	<b>Impactos ambientais na mineração</b> .....	16
<b>3.2</b>	<b>Processo de Flotação</b> .....	17
3.2.1	<i>Reagentes do processo mineral</i> .....	18
<b>3.3</b>	<b>Toxicidade dos reagentes de flotação</b> .....	19
<b>3.4</b>	<b>Ecotoxicologia</b> .....	21
3.4.1	<i>Testes de ecotoxicidade</i> .....	22
3.4.2	<i>Aspectos Legislativos</i> .....	23
<b>3.5</b>	<b>Bioindicadores aplicados em estudos de ecotoxicidade</b> .....	24
3.5.1	<i>Danio rerio (zebrafish)</i> .....	25
<b>3.6</b>	<b>Metabolismo de Carboidratos</b> .....	26
3.6.1	<i>Glicólise</i> .....	28
3.6.2	<i>Jejum</i> .....	29
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Materiais e Reagentes</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Estudos de ecotoxicidade</b> .....	33
<b>4.3</b>	<b>Análises bioquímicas dos peixes</b> .....	35
4.3.1	<i>Glicogênio</i> .....	35
4.3.2	<i>Glicose</i> .....	35
4.3.3	<i>Lactato</i> .....	36
<b>4.4</b>	<b>Concentração letal (CL50)</b> .....	36
<b>4.5</b>	<b>Monitoramento da qualidade da água</b> .....	37
4.5.1	<i>Degradação do isopropil xantato de sódio</i> .....	38
<b>4.6</b>	<b>Avaliações estatísticas dos dados</b> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>5.1</b>	<b>Estudos de ecotoxicidade</b> .....	40
5.1.1	<i>Reservas de glicogênio</i> .....	40
5.1.2	<i>Níveis de glicose e lactato</i> .....	42
5.1.3	<i>Jejum</i> .....	44
5.1.4	<i>Determinação da CL50</i> .....	46
<b>5.2</b>	<b>Monitoramento da qualidade da água</b> .....	48

5.2.1	<i>Degradação do isopropil xantato de sódio</i> .....	49
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental é uma problemática mundial, principalmente nos ambientes aquáticos, que são altamente complexos e diversos, pois compõem vários tipos de ecossistemas, como por exemplo, os rios, lagos e os oceanos. São produtos dinâmicos de interações entre os componentes bióticos, que são os seres vivos, e abióticos que são os aspectos físicos, químicos, físico-químicos do meio ambiente, tal como temperatura, luz, solo, pH e umidade (RAND *et al.*, 1995).

A degradação dos ecossistemas aquáticos é crítica e preocupante em razão da intensa atividade antropogênica sobre estes ambientes, comprometendo principalmente, a qualidade de vida dos organismos expostos a águas contaminadas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). De acordo com Van Der Oost *et al.* (2003), a contaminação hídrica pode levar à mortalidade desses organismos, além de afetar as taxas de crescimento, reprodução e comportamento. Nesse contexto, o setor mineiro está entre os que mais impactam o meio ambiente, por manusear grandes volumes de água, sólidos, reagentes residuais, entre outros. Os efluentes líquidos provenientes do beneficiamento mineral contêm, além de sólidos em suspensão, uma variada gama de reagentes utilizados nos processos de tratamento de minério, principalmente no processo de flotação (RUBIO *et al.*, 2010). Dentre esses reagentes destacam-se os íons xantatos, que reagem com os sólidos em suspensão transformando as superfícies hidrofílicas em hidrofóbicas através da adsorção na superfície das partículas que se deseja flotar (PENHA *et al.*, 2001).

Os peixes pertencem ao nível superior do ecossistema aquático, são consumidores na cadeia trófica e acumulam grande quantidade de substâncias persistentes. São bons indicadores de contaminação ambiental, pois seu metabolismo responde de forma similar ao dos mamíferos. Atualmente, várias espécies de peixes vêm sendo empregadas em testes de ecotoxicidade aquática (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Recomenda-se em geral, espécies pequenas e de fácil manutenção em laboratório (OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013), sendo uma das espécies em destaque o *Danio rerio*, um pequeno teleósteo que vem sendo usado como modelo experimental em pesquisas (EGAN, 2009). O perfil metabólico pode servir como índice do estado fisiológico e nutricional dos peixes (MORAES; BIDINOTTO, 2004), e, por essa razão, tornam-se indispensáveis estudos que possam esclarecer pontos relativos do seu metabolismo em situações de

contaminação (MOLLERKE *et al.*, 2003). A função do metabolismo de carboidratos é proporcionar a energia necessária para a manutenção dos processos vitais (SEIXAS FILHO, 2004) e o fígado é o principal órgão do metabolismo de substâncias tóxicas, sendo utilizado para avaliar a alteração do consumo energético através das taxas de glicose (SANCHO *et al.* 1998), igualmente essencial nos processos de acumulação, biotransformação e desintoxicação causados por substâncias contaminantes (PEIXOTO *et al.*, 2006).

Este trabalho visa avaliar o efeito das alterações no metabolismo de carboidratos, através da determinação do glicogênio, glicose e lactato no *Danio rerio* (zebrafish) frente a diferentes concentrações de íons xantato.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver estudos de ecotoxicidade do reagente de flotação isopropil xantato de sódio, utilizado na indústria de mineração, através da avaliação do seu efeito no metabolismo de carboidratos do bioindicador *Danio rerio*.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) determinar os parâmetros indicativos do metabolismo de carboidratos, glicogênio, glicose e lactato;
- b) estimar a CL50 dos íons xantato para o *Danio rerio* (zebrafish);
- c) avaliar a interferência do jejum no metabolismo de carboidratos do *Danio rerio*;
- d) avaliar a estabilidade do isopropil xantato de sódio nas condições estudadas e alguns parâmetros de qualidade da água.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Impactos Ambientais na mineração

O setor de extração mineral contribui muito para o desenvolvimento econômico e tecnológico em diversos setores, conferindo grandes vantagens para o desenvolvimento. No entanto, as diferentes atividades envolvidas na mineração aparecem dentro das que mais impactam o meio ambiente, gerando diferentes líquidos, sólidos e gases. Os principais poluentes gerados envolvem grandes volumes de água, sólidos, óleos, reagentes residuais (reagentes químicos), gases (poluentes na forma de aerossóis), metais pesados dissolvidos, dentre outros que devem ser manuseados e dispostos de forma adequada para prevenir impactos ao meio ambiente (RUBIO *et al.*, 2010).

Alguns autores relatam que os principais impactos ambientais decorrentes desta atividade são a supressão da vegetação ou impedimento de sua regeneração, queimadas, queima de mercúrio metálico ao ar livre, desencadeamento dos processos erosivos, a qualidade das águas dos rios e reservatórios da mesma bacia ajuante do empreendimento pode ser prejudicada em razão da turbidez provocada pelos sedimentos finos em suspensão, assim como pela poluição causada por substâncias lixiviadas e carreadas ou contidas nos efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxa, metais pesados, estes últimos podem também atingir as águas subterrâneas. O rebaixamento de calha de rios com a lavra de seus leitos pode provocar a instabilidade de suas margens, causando a supressão das matas ciliares.

Ainda de acordo com os autores, os impactos referidos anteriormente podem causar efeitos danosos no equilíbrio dos ecossistemas, tal como a redução ou destruição de hábitat, afugentamento da fauna, morte de espécimes da fauna e da flora terrestre e aquática, interrupção de corredores de fluxo gênico e de movimentação da biota (MECHI; SANCHES, 2010).

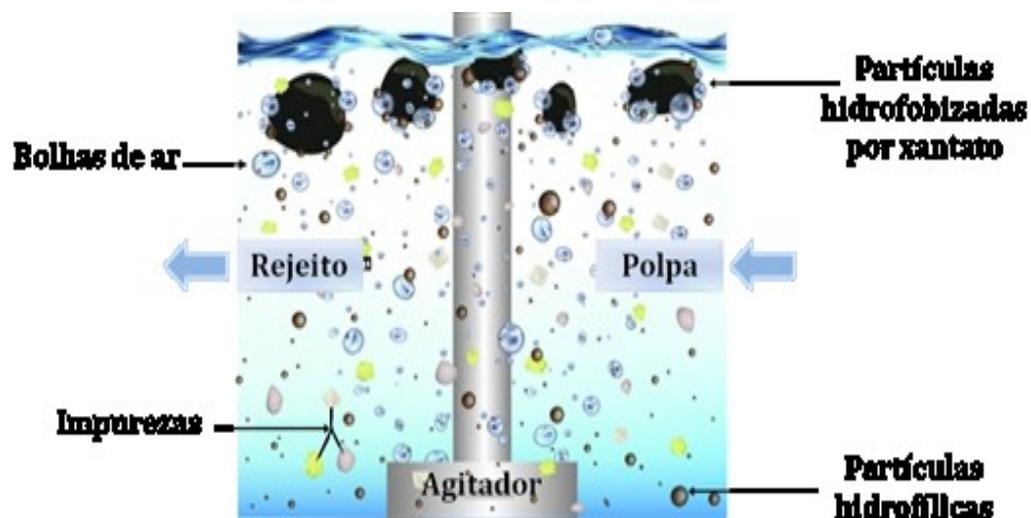
Dentre estes impactos, aqueles relacionados aos resíduos do beneficiamento mineral merecem atenção especial, sendo os mais comuns os efluentes líquidos, sólidos, poeiras, ruídos, emissões gasosas, vapores e resíduos orgânicos. Dentre estes, os efluentes líquidos provenientes do beneficiamento mineral contêm além de sólidos em suspensão uma variada gama de reagentes

utilizados nos processos de tratamento de minério, principalmente no processo de flotação (RUBIO *et al.*, 2010).

### 3.2 Processo de flotação

O processo de flotação (*froth flotation*) ou flotação por espumas é um dos principais (mais comum e importante) processo utilizado na indústria mineral. No processo ocorre uma separação entre os minerais de interesse, feita em uma suspensão em água (polpa), os minerais hidrofobizados são obrigados a percorrer um trajeto e, em dado instante, essas partículas que se deseja flotar são levadas a abandonar este percurso tomando um rumo ascendente, como podemos observar no esquema apresentado na Figura 1. A diferenciação entre as espécies minerais é dada pela capacidade de suas partículas se prenderem (ou prenderem a si) a bolhas de ar. Se uma partícula consegue capturar um número suficiente de bolhas, a densidade do conjunto partícula-bolhas torna-se menor que a do fluido e o conjunto se desloca verticalmente para a superfície, onde fica retido e é separado em uma espuma como podemos visualizar na Figura 2, sendo removido por transbordo ou mecanicamente, enquanto que as partículas dos demais minerais (hidrofílicas) mantêm inalterada a sua rota seguindo o fluxo de água (LEAL FILHO, 1995).

Figura 1 – Esquema do processo de flotação



Fonte: SILVA *et al.* (2014).

Figura 2 - Espuma formada no processo de flotação de minérios



Fonte: Cyttec, 2015.

Na flotação de minérios, é utilizada uma variedade de reagentes no processo de flotação com o objetivo de interagir na superfície mineral, influenciando as propriedades de superfície (BREMMELL *et al.*, 1999). Esses reagentes, também chamados de surfactantes, termo genérico que é dado para um grupo de substâncias cujas moléculas contêm um grupo hidrofílico (polar) em uma extremidade e um lipofílico (apolar) na outra, ligados entre si. O principal objetivo da adição de surfactantes é o recobrimento da superfície mineral, de modo que fique sobre a superfície um filme, tornando-a hidrofóbica. Os minerais hidrofobizados apresentam uma fraca afinidade pela água e conseqüentemente podem ser ligados às bolhas de ar, pois a superfície do mineral que é apresentada às bolhas não é mais a sua própria superfície, mas sim a superfície do surfactante (CHAVES *et al.*, 2010).

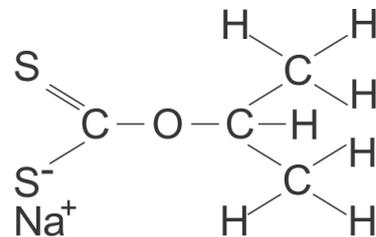
### 3.2.1 Reagentes do processo mineral

Os reagentes do processamento mineral são os agentes mais importantes na flotação e sua classificação é baseada em sua função específica no processo, sendo assim, são divididos em coletores, espumantes e modificadores. Os coletores são surfactantes que tem uma estrutura típica composta de uma parte de natureza molecular (não iônica) e outra de natureza polar (iônica), são separados em função da sua carga iônica, podendo ser aniônicos (⁻) ou catiônicos (⁺), conforme carga elétrica do grupo polar resultante da ionização da molécula (CHAVES *et al.*, 2010).

Os coletores aniônicos se subdividem de acordo com a função química, oxidrídlicos e sulfidrídlicos (BALTAR, 2008). Os aniônicos sulfidrídlicos são compostos que contêm o grupo –SH, associado a uma molécula orgânica, esses grupos coletores são utilizados na flotação de minerais sulfetados (CHAVES et al., 2010).

Dentre os principais coletores utilizados no processo de flotação destacam-se os íons xantato, também definidos como ditiocarbonatos (sais do ácido xântico) que pertencem a família dos tio-compostos. Estes reagentes são obtidos através da reação entre um álcool e um dissulfeto de carbono, sendo utilizados extensivamente para a flotação de sulfetos minerais e elementos metálicos como cobre, prata, ouro, chumbo, ferro e muitos minérios oxidados. Os íons xantato são solúveis em água e estáveis em solução, sais de coloração amarela com elevado poder coletor, maior seletividade, baixo custo e melhor desempenho metalúrgico em geral, sendo essas as razões do seu sucesso (RUBIO *et al.*, 2010, CYTEC, 2015).

Figura 3 – Proposta de estrutura química para o isopropil xantato de sódio



Fonte: Autoria própria, 2015.

### 3.3 Toxicidade dos reagentes de flotação

Anualmente, estima-se que dois bilhões de toneladas de minério são tratados por processo de flotação, utilizando grande quantidade de reagentes, e, conseqüentemente, gerando resíduos constituídos dos mesmos (PEARSE, 2005). A toxicidade dos reagentes e dos íons utilizados no processo de flotação é variada, sendo classificados de muito tóxicos, moderados e não tóxicos. O uso de concentrações excessivas pode ocasionar a presença de reagentes nas correntes

de rejeito, caracterizando, mesmo que em pequenas concentrações, um resíduo tóxico (RUBIO *et al.*, 2010).

Conforme Svobodová *et al.* (1993), os surfactantes podem causar danos nos componentes lipídicos presentes nas membranas celulares e a diminuição da tensão superficial da água, reduzindo a hidrofobicidade dos lipídios a nível celular, ocasionando uma super-hidratação, que em altas concentrações pode causar a supressão dos metabólitos evoluindo à necrose celular. Também, causam alterações comportamentais que compreendem em desordens respiratórias, aumento da taxa respiratória e busca por oxigênio na superfície, seguida de inatividade.

De acordo com Harris (1988) mesmo soluções diluídas dos íons xantatos são bastante tóxicas para peixes, não devendo entrar em contato com o ambiente aquático. Segundo Baungartne; Wolf (1964), o composto isopropil xantato de sódio também foi utilizado como um herbicida seletivo no controle de plantas daninhas. Em estudos realizados por Fuerstenau (1976), os primeiros usos dos reagentes de flotação do tipo xantato apresentaram alta toxicidade e foram comparados aos inseticidas.

Para contornar essa situação foram realizados estudos para a remoção dos íons xantato em meio aquoso, a partir da sua decomposição em função do pH (RAMIREZ *et al.*, 2006), e de reações biológicas (CHOCKALINGAM *et al.*, 2003) ou através da adsorção, utilizando zeólitas naturais, que demonstraram elevada capacidade de remoção (100%) de íons xantato a partir de uma concentração residual (OLIVEIRA; RUBIO, 2007). De acordo com King (1982), os íons xantato são decompostos lentamente em meios alcalinos, na faixa de pH 8,0 à 13,0, porém, em meios ácidos produz dissulfeto de carbono ( $CS_2$ ), que, segundo WHO (2000) apresenta periculosidade mais elevada do que o íon xantato que o origina.

De acordo com as especificações técnicas fornecidas pelo fabricante (Cytec, 2000) o isopropil xantato de sódio, comercialmente conhecido por AERO® 343 Xanthate, não é facilmente biodegradável e o seu aquecimento pode ocasionar combustão espontânea. Além disso, o contato direto com o material pode causar irritação na pele, olhos, mucosas e membrana do trato respiratório, podendo haver sensibilização cutânea moderada no contato direto. Em teste ecotoxicológico agudo (96h) para peixes, a espécie truta arco-íris apresentou a CL50 de 595 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto, Fuerstanau (1974) utilizando a mesma espécie de peixe determinou que

a CL50 (96h) para soluções de isopropil xantato de sódio é de 18 a 20 mg L<sup>-1</sup>. A literatura, como se verifica nesses valores, apresenta uma série de dados muitas vezes divergentes, uma vez que a toxicidade é altamente dependente das espécies em estudos. Além disso, até o momento não existiam estudos que avaliassem a toxicidade dos íons xantato para a espécie *Danio rerio* em casos de acidentes ou de despejos inadequados destes reagentes.

### 3.4 Ecotoxicologia

As substâncias são consideradas tóxicas quando provocam alterações na homeostase (equilíbrio) normal do organismo, produzindo uma resposta danosa. De acordo com a toxicologia três elementos básicos devem interagir: uma substância (agente) que seja capaz de produzir um efeito; um sistema biológico, com o qual a substância possa interagir e o efeito (resposta) que possa ser considerado nocivo ao sistema biológico. Desse modo a toxicidade é uma propriedade intrínseca que cada substância tem de produzir efeitos danosos a um determinado organismo quando este é exposto, durante certo período de tempo, em determinadas doses ou concentrações (OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013).

René Truhaut (1977) propôs, em 1969, o termo ecotoxicologia (integração da ecologia com a toxicologia) como um ramo da toxicologia voltado para o estudo dos efeitos adversos das substâncias sobre os ecossistemas, possibilitando o estabelecimento de medidas para proteger seus componentes dos efeitos adversos de poluentes ambientais. Atualmente, define-se como ecotoxicologia o estudo do destino e dos efeitos de substâncias químicas sobre os componentes de um ecossistema, baseado em métodos de laboratório e de campo (MATIAS, 1996; BRENTANO, 2006; OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013).

Dentre os ecossistemas, o aquático constitui um receptáculo temporário ou final de uma variedade e quantidade de contaminantes, sejam esses lançados no ar, solo ou diretamente nos corpos de água. No ambiente aquático a dispersão de um contaminante é a mais complexa, pois existem inúmeras diferenças em volume de diluição, características de mistura e velocidade de transporte. Além das interações dos contaminantes com os componentes abióticos há a interação com os componentes bióticos, e, desse modo o contaminante sofrerá dispersão, interação

com material particulado em suspensão, deposição e absorção biológica (OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013).

De acordo com Rand *et al.* (1995) o objetivo da ecotoxicologia aquática é avaliar o efeito de substâncias químicas sobre os organismos representativos do ecossistema aquático. Porém, é difícil avaliar quando ocorre a contaminação do meio aquático, verificada, muitas vezes, somente quando há grande mortalidade dos organismos, constituindo uma intoxicação aguda com doses acima da concentração letal. Entretanto, doses menores do que a letal promovem alterações na fisiologia e bioquímica dos organismos aquáticos (KREUTZ *et al.*, 2008).

#### 3.4.1 Testes de ecotoxicidade

Segundo Ronco *et al.* (2004), o desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é, também, um dos objetivos da ecotoxicologia, definindo limiares de toxicidade permissíveis com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões. No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Os ensaios ou testes de ecotoxicidade consistem em expor as espécies-teste representativas do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, durante um determinado período de tempo, observando seus efeitos sobre as funções biológicas, como o crescimento, desenvolvimento, reprodução, metabolismo e morte, estes que afetam diretamente as características das comunidades aquáticas (OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013).

Conforme Gherardi Goldstein *et al.* (1990), os testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste. Esses ensaios têm como objetivo estimar a dose ou a concentração de um contaminante que seria capaz de produzir uma resposta específica mensurável em um organismo ou população, em um período de tempo que é geralmente de 24 a 96 horas. Os testes de toxicidade aguda também podem ser aplicados para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado contaminante

isolado e as concentrações seguras para a preservação da vida aquática e do meio ambiente (RESGALLA Jr. *et al.*, 2002).

Segundo Olivi *et al.* (2008), o efeito medido em ensaios de ecotoxicidade aguda com organismos aquáticos é a letalidade ou outra manifestação que a antecede, como por exemplo a imobilidade. Os parâmetros mais utilizados são a DL50 (dose letal média) dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição (24 a 96 horas) e a CL50 (concentração letal média) concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição. Ainda de acordo com estes autores, as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias químicas e os testes de ecotoxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre os sistemas biológicos, um complementa o outro.

#### 3.4.2 Aspectos Legislativos

Atualmente no Brasil dispõe-se de legislação federal e estadual que trata de padrões para a toxicidade ambiental e qualidade da água. Cita-se a Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, alterada pela Resolução 410/2009 e pela Resolução 430/2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução 357.

Reporta-se a Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ainda pode-se mencionar a Resolução 129/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (CONSEMA), que dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para a toxicidade de efluentes líquidos em águas superficiais do Estado do RS.

Contudo, o isopropil xantato de sódio não pode ser enquadrado nestas legislações por não ter uma classificação toxicológica bem estabelecida e definida, os rejeitos de efluentes podem contaminar cursos de água próximos e os efeitos em peixes e principalmente na cadeia trófica desse produto químico introduzido no

processo de mineração deve ser determinado a fim de definir os fatores seguros para sua aplicação.

### 3.5 Bioindicadores aplicados em estudos de ecotoxicidade

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático (CALLISTO; GONÇALVES, 2002). Atualmente, várias espécies vêm sendo empregadas mundialmente em testes de ecotoxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos de diversos contaminantes em corpos receptores. Os principais grupos de organismos testes utilizados nos ensaios ecotoxicológicos são microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, moluscos, peixes, macrófitas e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

De acordo com Rand; Petrocelli (1985) para a escolha do organismo teste geralmente utiliza-se alguns critérios de seleção de espécies como a abundância e disponibilidade, cosmopolitismo da espécie, conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares, estabilidade genética e uniformidade das suas populações, baixo índice de sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial, facilidade de cultivo em laboratório, e se possível ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas.

Assim, os peixes são consumidores secundários e nas avaliações ecotoxicológicas representam os vertebrados nos ecossistemas aquáticos, sendo muitos os tipos de ensaios utilizando peixes. Em geral, recomendam espécies pequenas e de fácil manutenção em laboratório, sendo o *Danio rerio* uma das espécies em destaque (OLIVEIRA-FILHO; SISINNO, 2013).

#### 3.5.1 *Danio rerio* (zebrafish)

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha ou zebrafish é um peixe tropical teleósteo, ovíparo, onívoro, cipriniforme, da família dos ciprinídeos, nativo de córregos e rios na Índia. Tem ampla distribuição geográfica desde Bangladesh, Índia, Myanmar, Paquistão e Nepal (ARUNACHALAM *et al.*, 2013).

Algumas populações introduzidas habitam as águas dos Estados Unidos (Califórnia, Connecticut, Flórida e Novo México) e América do Sul (SPENCE *et al.*, 2008). Esta espécie é mais frequentemente encontrada em águas rasas e lentas perto da borda de rios ou em valas, sendo adaptáveis a uma ampla gama de temperaturas, (6 a 38°C). De acordo com Dammski *et al.* (2011) esta espécie suporta alterações de pH que variam de 5,9 a 8,5, e possuem comprimento médio de 3 cm a 5 cm, atuando como consumidores secundários na cadeia alimentar aquática (ABNT NBR 15088, 2011).

Figura 4 - *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)



Fonte: <http://www.socmucimm.org/introduction-zebrafish-danio-rerio/>

Segundo Westerfield (1994), o manejo deste bioindicador, assim como a facilidade de reprodução e manutenção, e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos na literatura. Existem numerosas vantagens para a utilização do *D. rerio* como uma espécie de modelo toxicológico, bem como para outras áreas, isso é evidente pelo número crescente de publicações que têm utilizado este organismo (SPITSBERGEN; KENT, 2003). Segundo Hill *et al.*(2005), no início de 1990 havia menos de 100 publicações relacionadas com esta espécie submetidos anualmente. Isto aumentou para aproximadamente 1.000 na virada do século e atualmente as médias estão em torno de 3.500 por ano. Os principais benefícios da utilização desta espécie como modelo toxicológico sobre outras espécies de vertebrados são com o que diz respeito ao seu tamanho, criação e

rápido desenvolvimento, reduzindo muito o espaço de manipulação e os custos de criação.

Em contraste com espécies maiores, o tamanho do *D. rerio* minimiza os custos, devido requerer pequenas quantidades de soluções experimentais minimizando o material de laboratório e produtos químicos, tanto para tratar e manter os peixes vivos quanto para a realização de vários ensaios com reagentes e avaliações histológicas (pequena de materiais de montagem e lâminas de microscópio) (HILL *et al.* 2002). Sendo que, um pequeno grupo pode manter-se numa fração do espaço necessário para manter um grupo equiparável de trutas ou salmões, que também são modelos biológicos em investigação (LELE *et al.* 1996).

Além disso, segundo Barbazuk *et al.*(2000), esta espécie apresenta um alto grau de similaridade com genes de humanos e camundongos, quando comparados em sua sequência genética. Recentemente, também foram desenvolvidos estudos avaliando características comportamentais do *D. rerio*, como ansiedade (EGAN *et al.*, 2009), estresse (CHAMPAGNE *et al.* 2010; PIATO *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2013), comportamento social e atividade locomotora (FONTAINE *et al.* 2008; SEIBT *et al.*, 2010). Esta espécie de vertebrado é amplamente utilizada nas investigações associadas com as áreas biomédicas, biologia comparada e evolutiva, entretanto, curiosamente, apesar da sua importância pouco se sabe sobre sua história natural, habitat e distribuição nativa (ARUNACHALAM *et al.*, 2013).

### **3.6 Metabolismo de Carboidratos**

Segundo Seixas Filho (2004), os animais aproveitam de forma diferente os alimentos, de acordo com suas habilidades em digerir e absorver os nutrientes e a energia contida nos mesmos. Assim, o metabolismo pode ser dividido em metabolismo externo, que compreende a quantidade e a qualidade das substâncias ingeridas e excretadas pelo organismo, e o metabolismo intermediário, no qual se incluem as transformações que ocorrem no interior do corpo, e ainda, tem a função de proporcionar a energia necessária para os processos vitais, compensar as perdas de substâncias resultantes dos desgastes e atender ao desenvolvimento e crescimento do organismo.

Neste contexto, nos organismos existem substâncias essenciais para o funcionamento das células, uma dessas substâncias é a glicose, um

monossacarídeo fundamental para a produção de energia metabolizada em todas as células. A glicose é imprescindível para o funcionamento do organismo e sua obtenção é basicamente através da alimentação. Entretanto, para suprir a queda em sua quantidade em períodos de privação, o organismo desenvolveu mecanismos para armazenar essa substância e mobilizá-la o mais rápido possível na forma de glicogênio (CHAMPE *et al.*, 2009).

Conforme Harris (2007), o glicogênio é um polissacarídeo formado por milhares de unidades de glicose. Os principais estoques de glicogênio são encontrados no músculo esquelético, que serve como reserva de combustível para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) durante a contração muscular, e no fígado, a função do glicogênio hepático é manter a concentração de glicose sanguínea. Ocorre uma variação nos níveis de glicogênio hepático, são altos logo após a alimentação e, depois diminuem lentamente à medida que é utilizado para ajudar a manter os níveis de glicose sanguínea entre a alimentação e durante o jejum. De acordo com Campbell; Farrell (2008), o glicogênio é a principal forma de armazenamento de carboidrato no fígado e sua deposição também ocorre no músculo, porém a maior parte do glicogênio muscular é consumida por este tecido, sem formação de glicose livre.

Segundo Champe *et al.* (2009), a glicogênese é a síntese do glicogênio, no fígado é estimulada quando os níveis de energia e disponibilidade de substrato estão elevados e no músculo esquelético começa assim que a musculatura entra em descanso. E, a glicogenólise é a degradação do glicogênio, no músculo esquelético ocorre durante a contração muscular, havendo uma necessidade rápida de ATP (energia), e no fígado é acelerada em períodos de jejum.

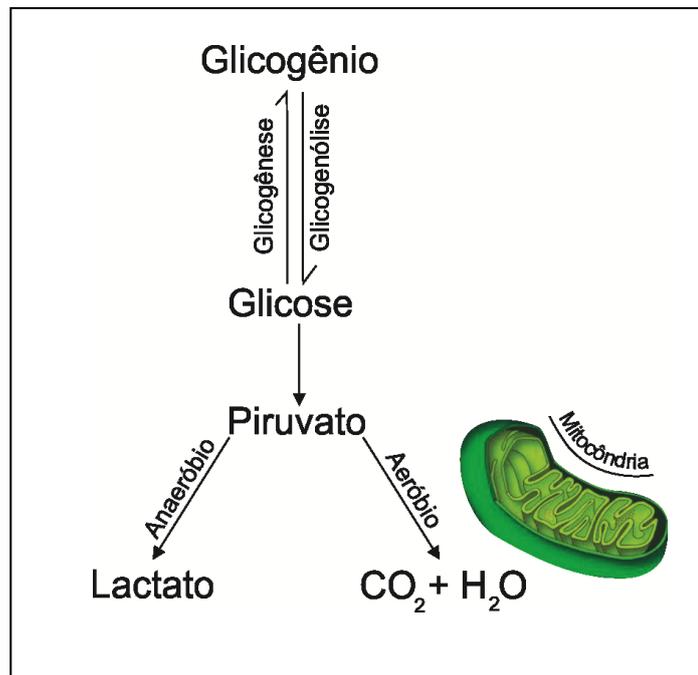
Sendo assim, o fígado é o principal órgão do metabolismo de substâncias tóxicas e é utilizado para avaliar a alteração do consumo energético através das taxas de glicose (SANCHO *et al.* 1998), sendo um órgão essencial nos processos de acumulação, biotransformação e desintoxicação causados por essas substâncias. Peixoto *et al.*, (2006) ressalta a importância deste órgão na regulação das taxas de glicose sanguínea, estocando-a em forma de glicogênio. Se houver uma redução no nível de glicose, o fígado transforma o glicogênio em glicose e o envia para o sangue para ser distribuído aos tecidos ou órgãos que o necessite.

### 3.6.1 Glicólise

A via glicolítica é utilizada em todos os tecidos no qual uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, com o objetivo de fornecer energia conservada na forma de ATP, e é a via essencial do metabolismo de carboidratos (energético) (NELSON; COX, 2011). O piruvato é o produto final da glicólise nas células com mitocôndrias e com fornecimento adequado de oxigênio, também denominada glicólise aeróbia, pois necessita da presença do oxigênio. Alternativamente, pode ocorrer a fermentação da glicose em ácido pirúvico (piruvato), que é reduzido e o seu produto resultará em ácido láctico (lactato), que recebe a denominação de glicólise anaeróbia, não necessitando da participação do oxigênio. A glicólise anaeróbia permite a produção de ATP em células sem mitocôndrias e que o oxigênio esteja em quantidade insuficiente. (CHAMPE *et al.*, 2009).

De acordo Harris (2007), ao contrário da glicólise, que produz ATP, a gliconeogênese, a síntese de “*novo de glicose*”, requer ATP e é, portanto um processo que requer energia. Assim através da gliconeogênese podem ser geradas moléculas de glicose a partir de outras moléculas orgânicas tais como lactato, piruvato, glicerol e alguns aminoácidos (RAHAMI; ABDOLLAH, 2007). Segundo Oruç; Üner (1999), os níveis de lactato têm sido muito utilizados como medida de metabolismo anaeróbio, pois o aumento desta atividade metabólica parece ser uma resposta rápida para o esgotamento de energia causado pela falta de oxigênio que ocorre após exposição a componentes tóxicos.

Figura 5 – Representação esquemática da Glicólise com processo aeróbio e anaeróbio



Fonte: Autoria própria, 2015.

### 3.6.2 Jejum

O perfil metabólico pode servir como índice do estado fisiológico e nutricional dos peixes (MORAES; BIDINOTTO, 2004). Para a maioria das espécies faz parte do seu ciclo de vida ter grande capacidade de resistir a longos períodos de jejum (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Vários fatores são responsáveis por este processo natural, como exemplo a disponibilidade de alimento, processo reprodutivo, a migração, incluindo a desova, e flutuações sazonais (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2012).

De acordo com Cook *et al.* (2000), sob condições normais de fornecimento diário de alimento, os peixes têm pouca necessidade de mobilizar energia para sua manutenção. Porém, quando os peixes recebem alimento abaixo das suas necessidades ou ficam longos períodos em jejum, a manutenção dos processos vitais acontece à custa da mobilização das reservas energéticas (JOBILING, 1994). O fígado e o músculo esquelético são as principais fontes de armazenamento de energia, liberando grande quantidade de substrato para a manutenção dos processos vitais (HORNICK *et al.*, 2000). Portanto, o esgotamento de energia que ocorre durante o jejum indica que os vários constituintes do corpo podem ser

mobilizados em diferentes taxas e que, estes substratos, podem ser utilizados de formas diferentes nos diversos tecidos do corpo (WEATHERLEY; GILL, 1987).

Conforme Champe *et al.*, (2009) o fígado é um órgão que está especialmente situado para processar e distribuir nutrientes, durante o período absorptivo, capta os carboidratos para serem metabolizados, armazenados ou desviados para outros tecidos. A função básica do metabolismo de carboidratos é manutenção da glicemia, e também, é controlada pelo fígado (NEWGARD *et al.*, 1983).

Durante o jejum, a glicose pode ser obtida a partir da glicogenólise, que é a quebra do glicogênio, ou ainda a partir da gliconeogênese (BLACK; LOVE, 1986). A síntese de glicose a partir de compostos não glicídicos, também chamada de gliconeogênese, que ocorre no fígado, satisfaz as necessidades de glicose do organismo em situações onde o carboidrato não é suficiente. Assim, o processo de gliconeogênese assume um papel fundamental durante o período de jejum, quando o glicogênio hepático esta sendo esgotado (RIBEIRO *et al.*, 2012).

A gliconeogênese é a rota responsável pela síntese de “*novo de glicose*”, e síntese de glicogênio a partir do lactato (CAMPBELL; FARRELL, 2008). Segundo Ribeiro *et al.* (2012), o lactato é considerado uma das substâncias gliconeogênicas mais importantes, sendo fonte de glicose sanguínea durante os estágios intermediários do jejum. Entretanto, de acordo com Sheridan; Mommsen (1991), os animais que estão se alimentando normalmente a gliconeogênese é poupada, sendo ativada apenas durante o jejum, especialmente quando há diminuição nos estoques de glicogênio no fígado. Em muitas espécies de peixes, o glicogênio é mobilizado no início da privação de alimento, mas o grau de depleção varia muito entre as espécies, desde uma rápida glicogenólise até uma parcial ou quase completa proteção das reservas de glicogênio durante o jejum.

Trabalhos já demonstraram a redução no glicogênio e glicose plasmática, como foi descrito por Barcellos *et al.*(2010) para *Rhamdia quelen* (Jundiá), onde o glicogênio hepático aumentou nas 24 horas do início do jejum e após 7 dias houve redução, e a glicose sanguínea não teve uma modificação significativa nos seus níveis, manteve-se em um nível constante durante diferentes períodos do jejum, sugerindo que o esgotamento precoce e rápido do glicogênio no fígado de peixes é uma fonte primária de energia em períodos de restrição alimentar. Deste modo, Navarro; Gutiérrez (1995) sugerem que nas fases iniciais ocorre a ativação do

glicogênio hepático, a fim de manter os níveis de glicose no plasma e satisfazer as exigências de energia.

Porém, alguns autores relatam o estado de hipoglicemia nos primeiros dias de jejum. De acordo com Pérez-Jiménez *et al.*(2007), o *Dicentrarchus labrax* (Robalo) entra num estado de hipoglicemia a partir do primeiro dia, e *Oncorhynchus mykiss* (Truta arco-íris) cinco dias de restrição alimentar já foram suficientes para uma diminuição significativa dos níveis de glicose sanguínea (FURNÉ *et al.*, 2012). Porém Hochachka; Sinclair (1962) demonstraram resultados onde houve diminuição do glicogênio hepático sem ocorrer modificação nos níveis de glicose para a mesma espécie de truta.

## 4 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de ética de uso animal (CEUA) da Universidade de Passo Fundo (UPF), onde foi aprovado e deferido para aplicação. Logo, a população de peixes estudados (*D. rerio*) foi adquirida a partir de um fornecedor comercial, localizado no município de Porto Alegre, RS e do Laboratório de Ictiopatologia, Faculdade de Medicina Veterinária (UPF), município de Passo Fundo, RS. Foram utilizados 253 adultos machos com peso que variaram de 0,956 a 0,211 gramas.

Os estudos de ecotoxicidade foram desenvolvidos nos meses de dezembro de 2013, março de 2014 e dezembro de 2014, sendo esses períodos escolhidos em função do metabolismo dos peixes. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Animal do Centro Universitário La Salle - Unilasalle, no município de Canoas, RS. Também foram tomados os devidos cuidados com o descarte da água contendo o isopropil xantato de sódio, de modo que ao término dos estudos, a mesma foi tratada com ajuste de pH para degradação do composto e posterior descarte na rede de esgoto. Da mesma forma, os peixes abatidos foram descartados nos coletores de lixo biológico da Instituição.

### 4.1 Materiais e Reagentes

Os materiais utilizados para o desenvolvimento da metodologia foram aquários de vidro nas medidas de 30x30x30, bombas de oxigenação sem carvão ativado, para prevenir uma possível adsorção do contaminante, rede de captura tipo puçá e vidrarias de uso geral. Os instrumentos usados para a realização das análises foram balança (Bel Engineering, Mark 210A.), banho-maria (Biopar, BMD01), termômetros, agitador vortex (Biomixer, QL-901), centrífuga (Fanem, 206-BL), espectrofotômetro de absorção molecular na região do visível (Femto, 700plus), pHmetro (Digimed, DM-22, máquina de gelo (Hexicrio). Também foram utilizados na realização das análises de monitoramento da água os reagentes: cromato de potássio, nitrato de prata 0,0141, EDTA 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, negro de Eriocromo-T, solução tampão, ácido sulfúrico, Iodeto Azida (NaOH + NaI), sulfato manganoso, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,025 mol.L<sup>-1</sup>, NaOH 6N, água deionizada e isopropil xantato de sódio (Cytec).

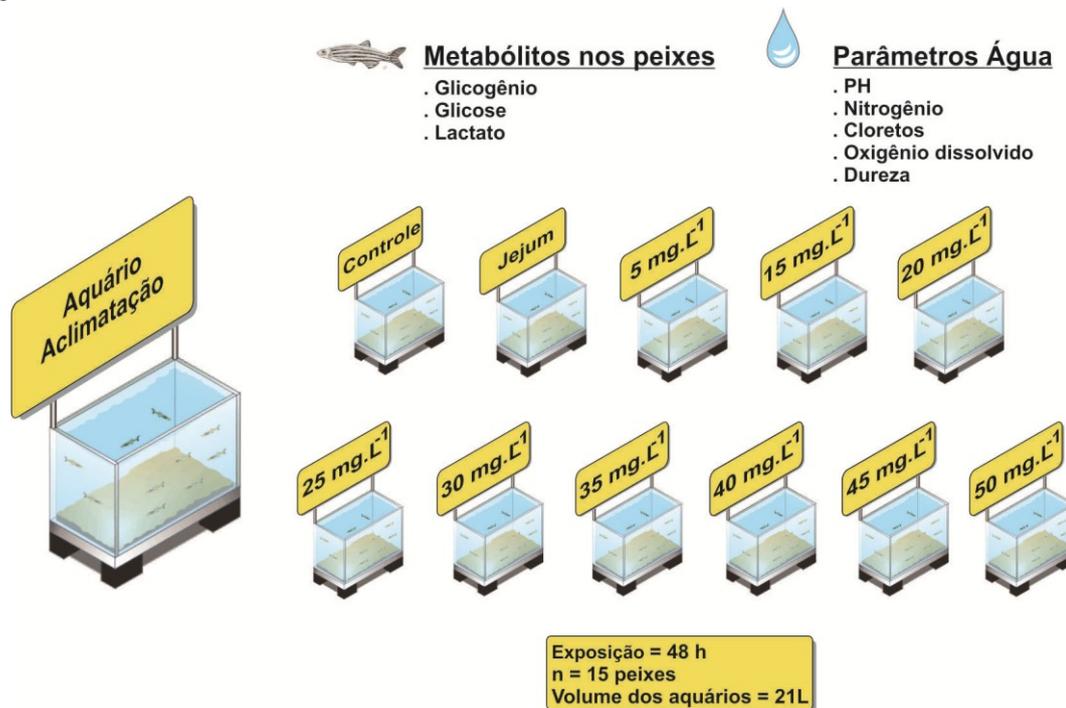
## 4.2 Estudos de ecotoxicidade

Os estudos de ecotoxicidade foram realizados de acordo com os procedimentos recomendados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15088 (ABNT, 2011) para estudos de ecotoxicologia aquática pelo método de ensaio com peixes. Dessa forma o *D. rerio* foi submetido a uma exposição aguda (48 horas) ao contaminante isopropil xantato de sódio.

Os peixes foram dispostos em aquários onde foi mantida uma relação entre a massa dos organismos e volume de água do recipiente de, no máximo, 1g de organismo por litro de água, por um período de 12 horas de luz, sendo, durante os estudos, alimentados com ração da marca Alcon Basic. Os indivíduos foram, inicialmente, acondicionados em um aquário com água de abastecimento por um período de sete dias antes do ensaio, para aclimação, a fim de eliminar possíveis indivíduos inaptos que pudessem interferir nos resultados. Após esse tratamento preliminar os peixes foram transferidos e distribuídos em 11 unidades experimentais com 21 litros de água de abastecimento. Cada unidade continha 15 peixes (n=15) deixados em repouso por 48 horas antes do experimento para aclimação, a fim de evitar o estresse.

A primeira unidade foi designada como grupo controle (CTR). Essa unidade experimental recebeu alimentação e ficou sem a presença do isopropil xantato de sódio. A segunda unidade foi denominada grupo jejum (J) e os peixes ficaram sem alimentação e sem o contaminante no período da exposição de 48 horas. As concentrações de isopropil xantato de sódio preparadas para os estudos foram de 5 mg L<sup>-1</sup>, 15 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup>, 35 mg L<sup>-1</sup>, 40 mg L<sup>-1</sup>, 45 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup>, e as unidades foram dispostas conforme a Figura 6. Essas concentrações foram escolhidas com base nas investigações de Hao *et al.* (2008), que realizou teste em laboratório com íons xantato em solução aquosa, utilizando espectrofotômetro de absorção molecular no comprimento de onda de 301 nm.

Figura 6 – Representação esquemática das unidades utilizadas nos testes de toxicidade e suas respectivas concentrações de contaminante isopropil xantato de sódio



Fonte: Autoria própria, 2015.

Diariamente foi verificada a taxa de sobrevivência dos animais durante o período de exposição, e o indivíduo morto, sempre que observado, foi removido do ensaio e a ocorrência registrada. Esse acompanhamento foi realizado para determinar a CL50(48h) do isopropil xantato de sódio para o *D. rerio*, para posterior análise estatística. Após o término do período de exposição aguda ao contaminante, os peixes foram capturados com rede e crioanestesiados (WILSON *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2013). O material ficou preservado sob congelamento em equipamento refrigerado a uma temperatura aproximada de -18°C, para posterior análise bioquímica.

A avaliação dos estudos de ecotoxicidade foi baseada nas medidas de parâmetros metabólicos dos peixes como glicogênio, glicose e lactato, bem como nas medidas da CL50(48h).

### 4.3 Análises bioquímicas dos peixes

Para as análises bioquímicas dos peixes foram separados 5 peixes de cada tratamento (n=5). Posteriormente, os peixes foram pesados (0,211 g. a 0,956 g.), as nadadeiras caudais foram retiradas e o indivíduo inteiro foi utilizado como amostra. Logo após foi feito o processamento do tecido para ser utilizado nas análises bioquímicas.

Para o processamento foi usado uma solução aquosa de KOH 30%, a 100 °C em banho-maria, por 1 hora. Após a digestão das amostras, os tubos foram resfriados e em cada um foram adicionadas 5 gotas de solução saturada de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Os tubos foram agitados em Vortex até a eliminação das bolhas de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ). Em seguida foram adicionados 4 mL de álcool etílico hidratado 92,8 INPM (álcool 96° GL), sendo as amostras novamente agitadas e centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm. Imediatamente, o sobrenadante foi descartado e o pelet lavado com 2 mL de água quente, sendo adicionados mais 4 mL de álcool etílico, agitado e centrifugado. O processo foi repetido 3 vezes.

No próximo passo, o pelet foi ressuspenso com 2 mL de água quente, e 500 µl dessa solução foram transferidos para outros tubos onde foram adicionados 500 µl de ácido clorídrico (HCl) 4 mol L<sup>-1</sup>. Os tubos foram tampados e deixados em banho-maria por 1 hora a 100 °C. Após resfriados, o  $\text{CO}_2$  foi removido com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 mol L<sup>-1</sup> (VAN HANDEL, 1965). Após esse procedimento as amostras foram usadas para as determinações de glicogênio, glicose e lactato.

#### 4.3.1 Glicogênio

Para a determinação do glicogênio foi utilizado o método de Van Handel (1965) e sua quantificação foi feita como glicose, após hidrólise ácida e neutralização.

#### 4.3.2 Glicose

A glicose foi determinada por meio do kit de glicose, referência 133 da marca Labtest Diagnóstica S.A. para as quantidades amostrais, sendo utilizados 80 µL de

amostra e 1000 µL de reagente em cada tubo. A Glicose Liquiform tem a finalidade de ser um sistema enzimático para a determinação da glicose no sangue. Deve-se misturar vigorosamente e incubar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, sendo que o nível de água deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. As absorbâncias do teste e do padrão foram analisadas em espectrofotômetro a 505 nm, acertando o zero com o branco e a cor é estável por 30 minutos.

#### **4.3.3 Lactato**

O lactato foi determinado após a digestão das amostras com o Kit da Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda, sendo utilizados 80 µL de amostra e 1000 µL de reagente em cada tubo de ensaio. Esse kit tem um sistema que se destina à determinação do lactato no plasma. Para dar continuidade ao procedimento deve-se homogeneizar bem e incubar durante 5 minutos a 37°C, e determinar as absorbâncias do teste e do padrão através de análise em espectrofotômetro a 540 nm, acertando o zero com o branco, a cor formada é estável por 30 minutos.

#### **4.4 Concentração letal (CL50)**

As medidas de concentração letal (CL50) foram realizadas com base na metodologia ABNT (2011) que estabelece que os resultados para determinar a concentração letal em estudos de ecotoxicologia aquática podem ser expressos em CL(I)50, CL50, fator de toxicidade ou de forma qualitativa, sempre referenciando o tempo de exposição do estudo. No caso de uso de substâncias químicas (contaminantes), como no presente estudo, a forma aplicada para expressar os resultados será dependente do grau de degradação da substância, de modo que se houver uma degradação superior à 20%, a CL(I)50 deve ser aplicada. Como não foi observada degradação dos íons xantato em concentração superior ao da norma estabelecida, o presente trabalho considerou a CL50. Os resultados serão válidos, se ao término do período do ensaio a porcentagem dos peixes mortos no grupo controle (CTR) for inferior a 10%, e a porcentagem de letalidade é calculada para cada concentração em relação ao número total de peixes utilizados.

#### 4.5 Monitoramento da qualidade da água

Os parâmetros monitorados foram realizados para garantir a sobrevivência dos peixes e assegurar que não houvesse alteração ou interferência nos parâmetros fisiológicos analisados.

A realização das análises de pH, cloretos, oxigênio dissolvido (OD), dureza total e nitrogênio amoniacal seguiram metodologia já estabelecida (APHA, 2012). Assim, para a medida do pH foi utilizada a determinação potenciométrica com um pHmetro calibrado com solução tampão com pH 4,01 e pH 6,86.

As concentrações de cloretos das soluções aquosas foram determinadas pelo método argentométrico. 100 mL da amostra foram pipetados e transferido para um Erlenmeyer, seguidos da adição de 1 mL de solução indicadora de cromato de potássio e titulação com uma solução padrão de nitrato de prata  $0,0141 \text{ mol L}^{-1}$  até mudança de coloração, sendo realizadas análises em triplicata.

A determinação de oxigênio dissolvido (OD) foi realizada através de coleta da amostra em um frasco de Winkler, onde foi adicionado 1 mL de solução de sulfato manganoso, seguido de 1 mL de solução de iodeto azida. O frasco foi fechado cuidadosamente para evitar formação de bolhas de ar e em seguida, o conteúdo foi misturado por inversão do frasco por alguns segundos para formação de um precipitado de cor castanho alaranjado, que indicava a presença de OD. Posteriormente, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado e, novamente, a solução foi misturada por inversão até total dissolução do precipitado. Em seguida, a amostra foi titulada com solução padrão de tiosulfato de sódio até o desaparecimento da coloração palha pálido. Logo após foram adicionadas gotas da solução de amido e a mostra foi titulada até o desaparecimento da coloração azul. A análise foi realizada em triplicata.

A dureza total foi determinada pelo método de complexometria com EDTA, onde 50 mL da amostra foram pipetados e transferidos para um Erlenmeyer. Recebendo 1 mL de solução tampão, de modo a obter pH  $10,0 \pm 0,1$ . Após, 0,1g de indicador negro eriocromo-T foi adicionado e uma titulação com a solução padrão de EDTA  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foi realizada até a mudança de coloração. Realizou-se a análise em triplicata.

A determinação da concentração de nitrogênio amoniacal nas amostras de solução aquosa foi realizada utilizando um kit analítico (marca Macherey-Nagel) para

a determinação colorimétrica de amônia nas faixas de concentração de 0,2 – 3 mg L<sup>-1</sup>. Nesse método, um tubo de ensaio foi ambientado com a amostra de água a ser analisada, sendo preenchido com 5 mL de amostra com 10 gotas de uma solução de hidróxido de sódio (<5%). Em seguida foi adicionada uma medida padrão do conteúdo do frasco 2 e misturado. Após 5 minutos 4 gotas do frasco 3 foram adicionadas e, após novamente 5 minutos a coloração desenvolvida foi comparada com a escala de cores que acompanha o kit para determinação da concentração.

#### *4.5.1 Degradação do isopropil xantato de sódio*

A degradação do isopropil xantato de sódio foi monitorada em todos os estudos para garantir que os peixes sempre estavam expostos ao contaminante.

Inicialmente uma curva de calibração foi construída de acordo com o método de análise espectrofotométrica de Woodcock; Jones (1973) com diferentes concentrações de solução de íons xantato com subsequência leitura de absorbância em espectrofotômetro de absorção molecular, a 301 nm. O preparo desta curva de calibração foi realizado medindo 1 L de água deionizada em um balão volumétrico e transferido este para um Becker, onde um pHmetro foi imerso para ajuste de pH em 8,5 com soluções de NaOH previamente preparadas. Em seguida preparou-se uma solução de concentração 50 mg L<sup>-1</sup> à partir de 0,05g de isopropil xantato de sódio foi preparada e o pH foi imediatamente ajustado para 8,5 para evitar qualquer degradação do reagente. Esta solução foi diluída em diferentes concentrações, cujas alíquotas foram transferidas para uma cubeta de quartzo, sendo a absorbância medida em um espectrofotômetro de absorção molecular à 301nm. Os resultados de absorbância e de concentração foram plotados em um gráfico e a linearização da curva forneceu uma equação da reta que permitiu o cálculo das concentrações de íons isopropil xantato nas soluções em estudo.

#### **4.6 Avaliações estatísticas dos dados**

Os resultados dos parâmetros metabólicos são expressos como médias ± erro padrão, e para cada tratamento foi utilizado um n=5. Posteriormente, foi

aplicado o teste estatístico ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. As análises tem nível de significância de  $P < 0,05$  e foram realizadas por meio do programa Graph Pad InStat 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA), conforme (ZAR, 1996).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

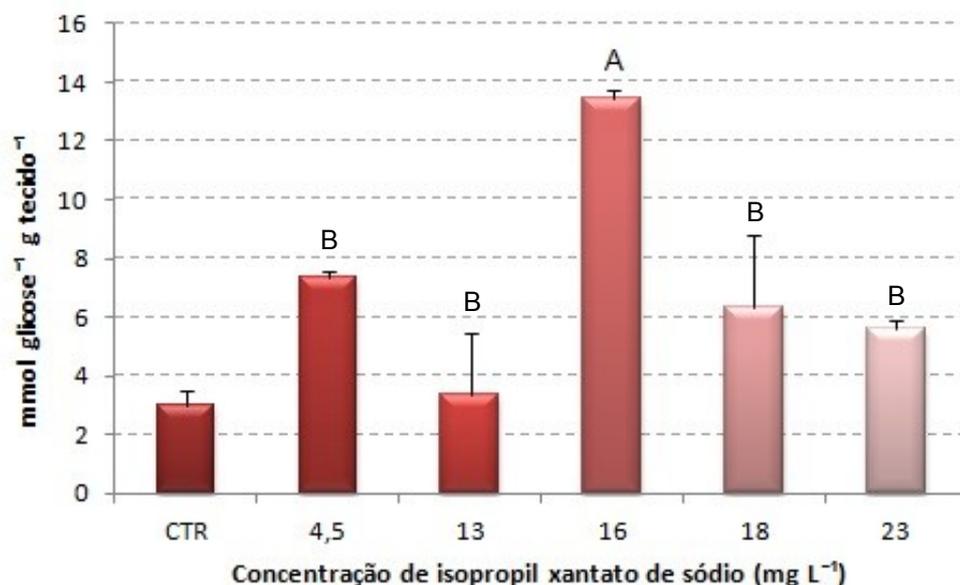
### 5.1 Estudos de ecotoxicidade

Devido à inexistência de trabalhos relacionados à alteração no metabolismo do *D. rerio* e também de estudos de ecotoxicidade do contaminante isopropil xantato de sódio sobre esta espécie, usou-se citações de trabalhos com agroquímicos que estão classificados e outras espécies de peixes.

#### 5.1.1 Reservas de Glicogênio

Os exemplares de *Danio rerio* expostos ao isopropil xantato de sódio no período de 48 horas demonstraram uma alteração nos níveis de glicogênio. Apenas na concentração de 16 mg L<sup>-1</sup> foi observado um aumento significativo ( $\pm$  348%), quando comparado ao grupo controle (CTR), conforme Gráfico 1.

Gráfico 1 - Reservas de glicogênio do *Danio rerio* exposto ao isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. ANOVA seguido de teste de Dunnett (A) indica aumento significativo entre CTR e a concentração dos íons xantato e (B) indica que não houve alteração significativa entre CTR e a concentração dos íons xantato ( $P < 0,05$  e  $n = 5$ ). Fonte: Autoria própria, 2015.

Frente às demais concentrações não foram observadas alterações significativas nas reservas de glicogênio, sugerindo uma tentativa em preservar essa

reserva para suprir uma futura demanda energética inerente aos processos de manutenção da homeostasia. Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo também foram constatados por outros autores, avaliando diferentes agroquímicos em outras espécies de peixes.

Miron *et al.* (2009), utilizando *Rhamdia quelen* (jundiá) exposto ao clomazone e quinclorac, observaram um aumento no glicogênio hepático e uma redução nos níveis de glicose e lactato, indicando uma gliconeogênese hepática aumentada, sugerindo uma estratégia de armazenamento de energia devido ao aumento da demanda metabólica para o processo de detoxificação. O efeito do aumento no glicogênio hepático em peixes *Leporinus obtusidens* (piava) com o uso de clomazone se repetem novamente em estudos realizados por Crestani (2004).

Em 2006 Crestani *et al.* em outro estudo, expos o *Rhamdia quelen* (jundiá) ao herbicida clomazone e constatou novamente aumento nos níveis de glicogênio hepático. Já no tecido muscular, esses autores constataram uma redução significativa. Esse mesmo resultado observado por Crestani *et al.*, em 2006, nos diferentes tecidos, foi encontrado também por Gluszczack *et al.* (2006) na mesma espécie de peixes usando glifosato como contaminante, o que pode indicar que o estresse químico causado pelo herbicida é acompanhado por degradação rápida do glicogênio muscular. Oruç; Üner (1999) propõem que o glicogênio muscular foi utilizado como fonte de energia para compensar a situação de estresse acumulando as reservas de glicogênio no fígado caso a contaminação prossiga, sendo este um dos efeitos do estresse oxidativo em peixes.

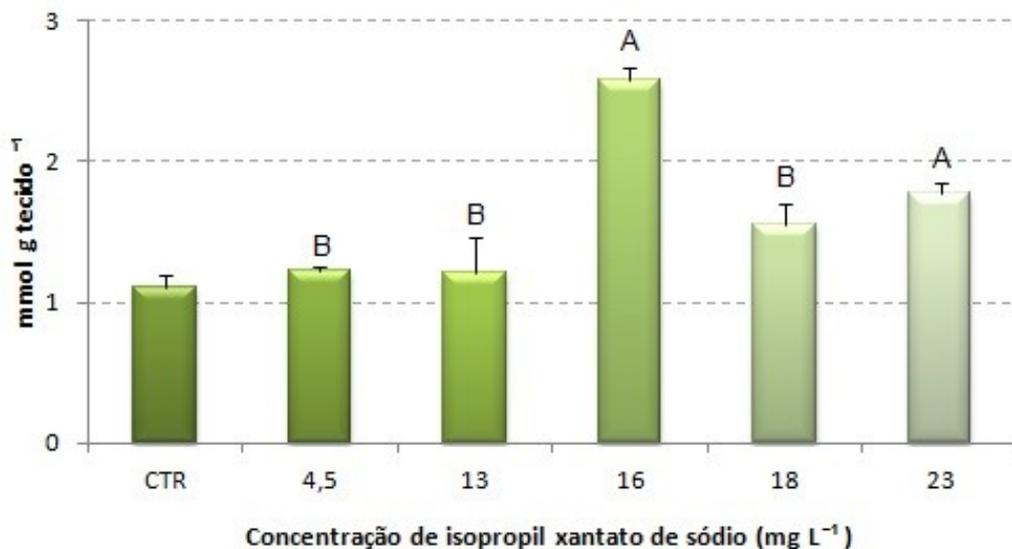
Sinhorin *et al.* (2014) observaram uma redução significativa ( $\pm 41\%$ ) nos níveis de glicogênio do fígado e no músculo no *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim) exposto ao herbicida glifosato. Igualmente, Rempel (2014) também observou redução no glicogênio hepático e muscular de *Rhamdia quelen* (jundiá) exposto aos herbicidas glifosato e herbimix.

Uma vez que o fígado é o órgão mais importante para a síntese e armazenamento de glicogênio, mantém a manutenção dos níveis de glicose sanguínea, bem como é um tecido de desintoxicação de contaminantes. Assim, os níveis de glicogênio podem apresentar resultados diferentes, havendo aumento ou redução, e, essa variação depende da espécie estudada, do contaminante e das concentrações utilizadas (SUAREZ; MOMMESEN, 1987).

### 5.1.2 Níveis de Glicose e Lactato

Os níveis de glicose demonstraram um aumento significativo apenas nos grupos de 16 mg L<sup>-1</sup> (± 234%) e de 23 mg L<sup>-1</sup> (± 162%), quando comparados ao grupo CTR, como pode ser observado no Gráfico 2.

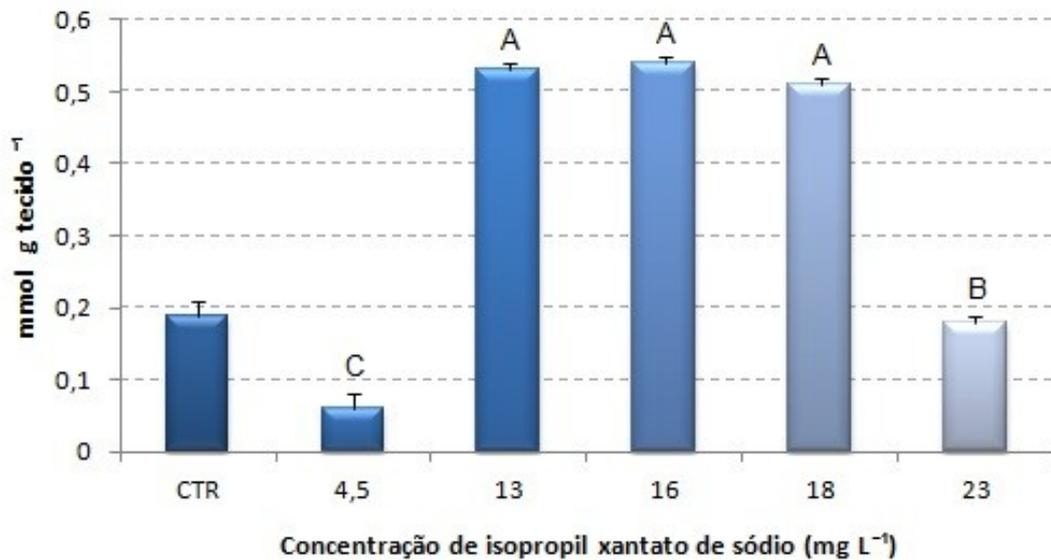
Gráfico 2 - Níveis de glicose do *Danio rerio* exposto ao isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações



Resultados expressos como média ± erro padrão. ANOVA seguido de teste de Dunnett. (A) indica aumento significativo entre CTR e a concentração dos íons xantato e (B) indica que não houve alteração significativa entre CTR e a concentração dos íons xantato ( $P < 0,05$  e  $n = 5$ ). Fonte: Autoria própria, 2015.

Nos níveis de lactato foi observado um aumento significativo nas concentrações de 13 mg L<sup>-1</sup> (± 279%), 16 mg L<sup>-1</sup> (± 284%) e 18 mg L<sup>-1</sup> (± 268), contudo houve uma redução significativa (± 69%) na concentração de 4,5 mg L<sup>-1</sup>, quando comparados ao grupo CTR, conforme Gráfico 3.

Gráfico 3 - Níveis de lactato do *Danio rerio* exposto ao isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. ANOVA seguido de teste de Dunnett. (A) indica aumento significativo entre CTR e a concentração dos íons xantato, (B) indica que não houve alteração significativa entre CTR e a concentração dos íons xantato e (C) indica redução significativa entre CTR e a concentração dos íons xantato ( $P < 0,05$  e  $n = 5$ ).

Fonte: Autoria própria, 2015

Neste estudo ocorreu um aumento significativo nos níveis de lactato, indicando que a exposição aos íons xantato pode levar a uma situação de estresse químico ao peixe, e sugerindo uma possível hipóxia tecidual pelo aumento da demanda energética frente à exposição ao contaminante na busca pela homeostase, levando ao uso de uma rota alternativa. Contudo, a redução significativa na concentração de 4,5 mg L<sup>-1</sup>, provavelmente, se deve a manutenção das reservas de glicogênio e nos níveis de glicose, pois não ocorreu redução significativa em relação ao grupo controle como visto anteriormente.

Pode-se observar que mesmo variando os grupos químicos de contaminantes e a espécie de peixe, a influência sobre alterações no metabolismo de carboidratos é demonstrada através das alterações nos níveis de glicose e lactato sendo evidenciada por vários autores. Nos estudos em que espécimes de *Rhamdia quelen* (jundiá) foram expostos ao clomazone, Crestani (2004) observou um aumento na glicose e no lactato, sugerindo que a hiperglicemia deve estar associada à gliconeogênese por outra rota metabólica que não a hepática, transformando lactato em glicose, e assim, aumentando os níveis deste no plasma. Em outro estudo com o jundiá exposto ao herbicida quinclorac, Menezes *et al.*

(2014), também observaram um aumento nos níveis de lactato, sugerindo que a exposição ao químico provoca estresse no animal e que ocorre uma glicólise anaeróbia em resposta aos efeitos do quinclorac sobre o esgotamento de energia.

Entretanto, Zeppenfeld *et al.* (2014) observaram uma redução nos níveis de glicose para *Rhamdia quelen* (Jundiá) no fígado e músculo, quando foram expostos somente ao estresse físico, indicando que o metabolismo de carboidratos foi usado para fornecer energia. Também foi observada a redução dos níveis de lactato no fígado, sugerindo que o metabolismo aeróbio foi a principal fonte de energia, no entanto, no músculo os níveis baixos de glicose foram associados com os níveis de lactato elevados, indicando o uso concomitante da via anaeróbia. Rempel (2014), em estudos com os herbicidas glifosato e Herbimix®, utilizando a mesma espécie de peixe, também observou uma redução dos níveis de glicose e um aumento nos níveis de lactato.

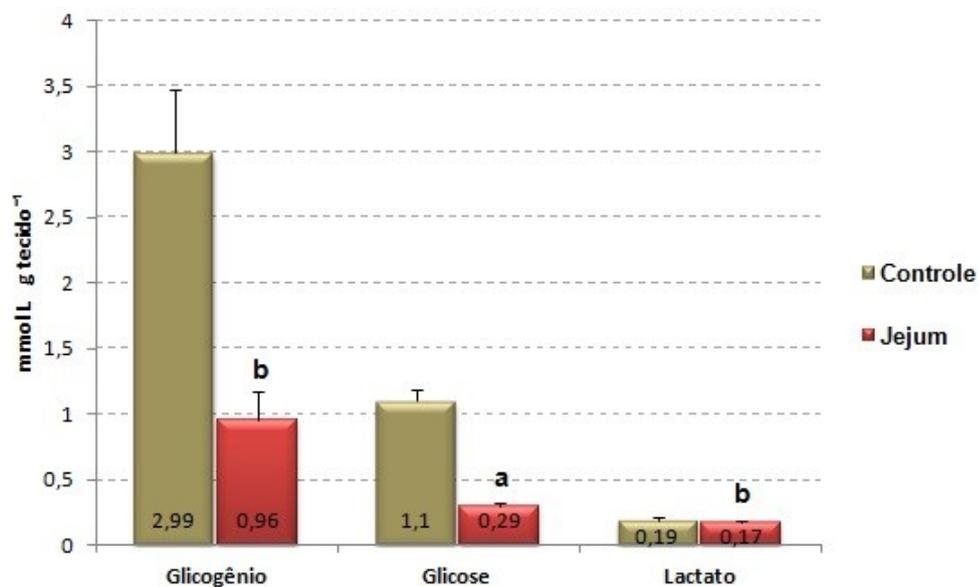
Em estudos com *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim) exposto ao herbicida glifosato, Sinhorin *et al.* (2014) constataram uma redução significativa nos níveis de glicose no plasma, indicando que a diminuição da glicemia pode ser atribuída ao consumo rápido de glicose nos tecidos em reação ao contaminante, porém no fígado foi observado um aumento significativo. Ainda, os níveis de lactato sofreram aumento significativo no plasma e no fígado, contudo houve uma redução no músculo, indicando que provavelmente o tecido hepático realizou glicogenólise acompanhada da ativação da gliconeogênese pelo lactato, originada pela intensa atividade muscular em condições de hipóxia (FONSECA *et al.*, 2008). Entretanto, Miron *et al.*, (2009) observaram uma redução significativa nos níveis de glicose (fígado e músculo) e lactato para *Leporinus obtusidens* (piava) expostos ao clomazone.

### 5.1.3 Jejum

O objetivo do grupo (J) era averiguar o quanto a alimentação poderia vir a interferir nos parâmetros do metabolismo de carboidratos do *D. rerio* para assegurar os resultados do glicogênio, glicose e lactato, avaliando que as alterações nos parâmetros bioquímicos são realmente da ação do contaminante e não do jejum. Isso justifica porque não foi seguida a NBR 15088 (ABNT, 2011), que recomenda a realização dos estudos com os peixes em jejum.

As demandas de energia para manter os processos vitais dos peixes durante o jejum são atendidas através da mobilização das reservas de energia (VIGLIANO *et al.*, 2002). No presente estudo não houve alterações significativas no lactato e nas reservas de glicogênio para o grupo que permaneceu em jejum no período de 48 horas. Porém, pode-se observar uma leve redução do glicogênio, sugerindo um possível início da glicogenólise que ainda não é suficiente para a manutenção da glicose. Pois há, uma redução significativa ( $\pm 73\%$ ) na concentração de glicose sanguínea ( $0,29 \pm 0,03$ ) no grupo (J) quando comparado ao grupo (CTR) ( $1,1 \pm 0,09$ ), podendo ser observada no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Parâmetros bioquímicos do grupo jejum comparados ao grupo controle



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. ANOVA seguido de teste de Dunnett. (a) indica redução significativa entre CTR e o jejum e (b) indica que não houve alteração significativa entre CTR e o jejum ( $P < 0,05$  e  $n = 5$ ).

Fonte: Autoria própria, 2015.

Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies de peixes. De acordo com Pérez-Jiménez *et al.* (2007), *Dicentrarchus labrax* (Robalo) entra num estado de hipoglicemia a partir do primeiro dia de jejum. Furné *et al.* (2012) também relatou que 5 dias de restrição alimentar já foram suficientes para uma diminuição significativa dos níveis de glicose sanguínea para *Oncorhynchus mykiss* (Truta arco-íris). Pérez-Jiménez *et al.* (2012) constataram uma redução nos níveis de glicose de  $\pm 51\%$  em relação ao grupo controle para *Dentex dentex*, e ainda Ashouri *et al.*

(2014) também observaram uma diminuição na glicose em estudos com *Acipenser baeri baerii* (Esturjão Siberiano).

No entanto, Barcellos *et al.*(2010) observou em *Rhamdia quelen* (Jundiá), que o glicogênio hepático teve um aumento nas 24 horas do início do jejum e após 7 dias houve redução. O esgotamento precoce e rápido do glicogênio no fígado de peixes sugere que este é uma fonte primária de energia em períodos de restrição alimentar. Já a glicose sanguínea não teve uma modificação significativa nos seus níveis, mantendo-se constante durante os diferentes períodos do jejum. A manutenção nos níveis de glicose em *Pagrus pagrus* submetidos ao jejum também foi relatada por Caruso *et al.* (2012). Segundo, Navarro; Gutiérrez (1995) nas fases iniciais do jejum ocorre a ativação do glicogênio hepático, a fim de manter os níveis de glicose no plasma e satisfazer as exigências de energia.

#### 5.1.4 Determinação da CL50

Nos ensaios de ecotoxicidade aguda, em 48 horas, não foi verificada mortalidade no grupo controle (CTR) e no grupo jejum (J). Da mesma forma, os peixes expostos ao reagente isopropil xantato de sódio nas unidades experimentais de concentrações de 4,5 mg L<sup>-1</sup>, 13 mg L<sup>-1</sup>, 16 mg L<sup>-1</sup> e 18 mg L<sup>-1</sup> também não apresentaram mortalidade. Entretanto, nas unidades experimentais em que o *D. rerio* foi exposto às demais concentrações foi verificada 100% de mortalidade logo nas primeiras 24 horas do ensaio. Contudo, na concentração de 23 mg L<sup>-1</sup> ocorreu a morte de 21 indivíduos de um total de 45 peixes ( $\pm 47\%$ ).

A CL50 (48h) do reagente isopropil xantato de sódio obtida para a espécie estudada apresentou um valor estimado de 23 mg L<sup>-1</sup>, conforme NBR 15088 (ABNT, 2011), sendo esta considerada ligeiramente tóxica, de acordo com as classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos apresentados por Zucker (1985), conforme tabela 1.

Tabela 1 - Classes de toxicidade aguda para organismos aquáticos

Classe de Ecotoxicidade	CL50 (mg L <sup>-1</sup> )
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	>1,0 a 10
Ligeiramente tóxico	>10 a >100
Praticamente não tóxico	>100

Fonte: ZUCKER, 1985.

A CL50 (48h) do isopropil xantato de sódio obtida neste estudo foi inferior ao que é apresentada nas especificações técnicas. De acordo com Cytec (2000), a CL50 é de 595 mg L<sup>-1</sup>, sendo os ensaios ecotoxicológicos realizados para peixes da espécie truta arco-íris, que é uma espécie maior do que *D. rerio*. Entretanto, Fuerstanau (1974) utilizando a mesma espécie de peixe (truta arco-íris) determinou que a CL50 para o isopropil xantato de sódio era de 18 a 20 mg L<sup>-1</sup>, sendo esse resultado muito próximo ao que foi determinado neste estudo. Ainda, Hawley (1972) determinou a CL50 do isopropil xantato de sódio para *Pimephales promelas* e o valor obtido foi de aproximadamente 5,6 mg L<sup>-1</sup>, sendo considerado de elevado poder de toxicidade este contaminante. A NBR 15088 recomenda o uso de *Pimephales promelas* e *D.rerio* para a realização de ensaios ecotoxicológicos por se tratarem de espécies de tamanho reduzido e necessitarem de parâmetros da água bem próximos.

Ainda, podemos observar em estudos realizados por Kreutz *et al.* (2008) com *Rhamdia quelen* (jundiá), onde determinaram a CL50 de quatro herbicidas, dois fungicidas e um inseticidas, sendo eles respectivamente: glifosato (7,3 mg L<sup>-1</sup>), atrazina (10,2 mg L<sup>-1</sup>), atrazina-simazina (10,5 mg L<sup>-1</sup>), mesotrione (532 mg L<sup>-1</sup>), tebuconazol (5,3 mg L<sup>-1</sup>), estrobilurina e triazol (9,9 mg L<sup>-1</sup>) e metil-paration (4,8 mg L<sup>-1</sup>), pois alguns aspectos da toxicidade destes agroquímicos necessitavam ser investigados para que no futuro esses dados sejam úteis na realização de estudos dos efeitos a longo prazo.

## 5.2 Monitoramento da qualidade da água

De acordo com Goulart; Callisto (2003) é de extrema importância o monitoramento das propriedades físico-químicas na avaliação dos impactos ambientais que ocorre no ambiente aquático, pois constata imediatamente as modificações nos parâmetros físico-químicos da água, ocorrendo a identificação precisa da variável modificada e determinando as concentrações alteradas. A Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005) estabelece para as classes I e II das águas o valor mínimo de OD de 5,0 mg L<sup>-1</sup> para a preservação da vida aquática.

A tabela 2 mostra os resultados dos valores dos parâmetros de qualidade da água realizada em todos os estudos.

Tabela 2 - Parâmetros de qualidade da água em função da concentração de íons xantato

		Concentrações de isopropil xantato de sódio (mg L <sup>-1</sup> )								
		5	15	20	25	30	35	40	45	50
Parâmetros da água	OD	7,05	7,05	7,1	7,27	7,95	7,8	7,57	7,73	7,5
	pH	7,7	8,48	7,18	7,45	7,57	7,74	7,62	7,82	7,52
	Dureza	59,87	43,9	48,19	48,1	40,16	52,21	47,39	49,4	46,7
	Cloretos	11,58	15,94	11,56	13,25	15,64	11,95	12,95	12,9	13,55

As unidades dos parâmetros da água são expressas em: OD (mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), dureza (mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) e cloretos (mgCl L<sup>-1</sup>). Fonte: Autoria própria, 2015.

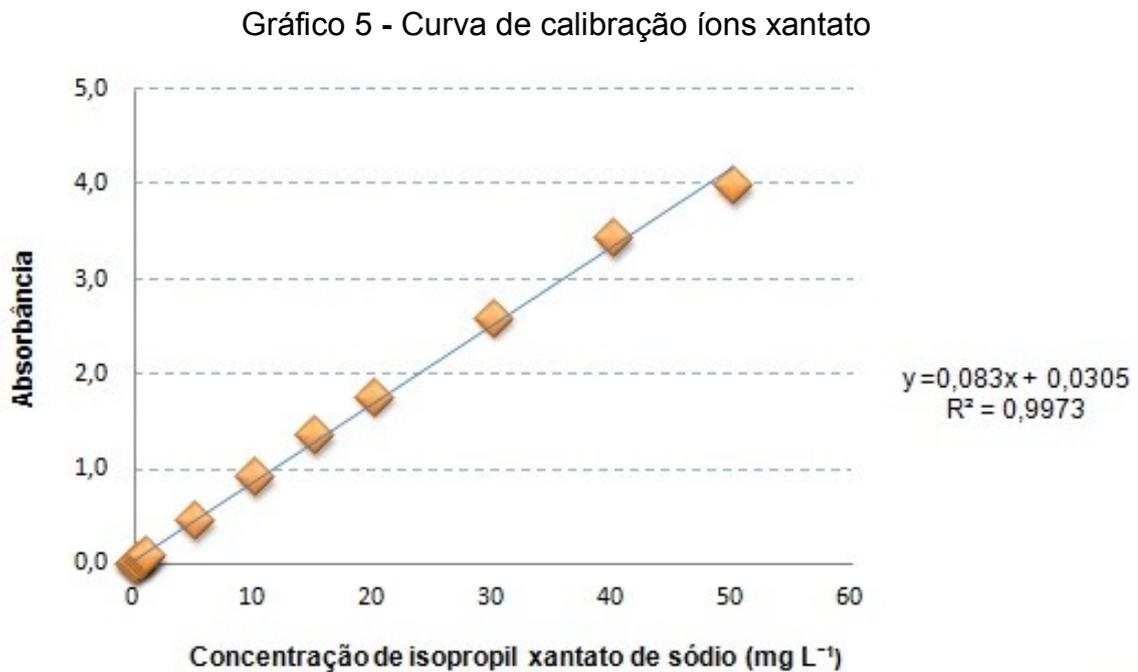
A partir desses dados, foi possível observar que ao longo dos estudos as concentrações de OD em todos os aquários permaneceram dentro dos limites aceitáveis para NBR 15088 (ABNT, 2011) e Resolução CONAMA 357/2005, estando acima do limite exigido de 5,0 mg L. Adicionalmente, o pH da água permaneceu entre 7,18 a 8,48 indicando que não houve influencia do pH sobre a degradação dos íons xantato, pois de acordo com Silva *et al.* (2014), o reagente apresenta degradação somente em valores de pH inferiores a 7,0.

Os valores de dureza da água também permaneceram constantes variando de 40,16 a 59,87 mg<sub>CaCO<sub>3</sub></sub> L. As concentrações de cloretos também apareceram estáveis na faixa de 11,56 a 15,94 mg L, sendo o valor inferior aos padrões de qualidade da água estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005).

Adicionalmente, a concentração de nitrogênio amoniacal foi medida nos primeiros estudos e apresentou valores inferiores a 0,5 mg L. Esses resultados iniciais permitiram observar que não houve adição significativa deste composto na água dos estudos, sendo descartada a significância dos excrementos dos peixes sobre os resultados. A temperatura da água variou de 22,7 a 24,9 °C, conforme recomendado pela NBR 15088 (ABNT, 2011). Todos os resultados dos parâmetros de qualidade da água comprovam que não houve variações nas características da água de abastecimento, excluindo-se qualquer interferência relacionada à composição da água fornecida durante o período dos estudos.

### 5.2.1 Degradação do isopropil xantato de sódio

A curva de calibração para a determinação das concentrações de isopropil xantato de sódio nos estudos é apresentada no gráfico 5.



Fonte: Autoria própria, 2015.

Foi verificado que no momento da diluição das concentrações nominais dos íons xantato em água ocorreu redução em seus valores. Os testes de ecotoxicidade foram realizados com as concentrações aferidas como é demonstrado na tabela 3.

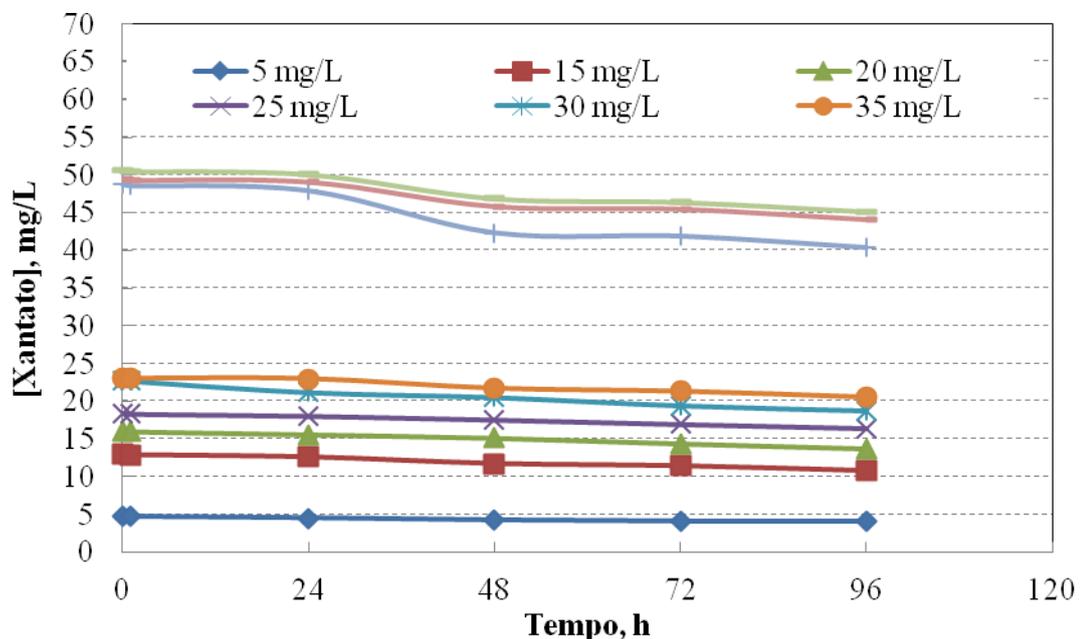
Tabela 3 – Concentrações dos íons xantato nominais e aferidas no estudo

Concentração nominal	5 mg L <sup>-1</sup>	15 mg L <sup>-1</sup>	20 mg L <sup>-1</sup>	25 mg L <sup>-1</sup>	30 mg L <sup>-1</sup>
Concentração aferida	4,5 mg L <sup>-1</sup>	13 mg L <sup>-1</sup>	16 mg L <sup>-1</sup>	18 mg L <sup>-1</sup>	23 mg L <sup>-1</sup>

Fonte: Autoria própria, 2015.

O monitoramento das concentrações do contaminante na água pode ser visualizado no gráfico 6. A degradação das concentrações dos íons xantato durante o período dos estudos foi de no máximo 17%, comprovando que o isopropil xantato de sódio esteve presente na água durante todo o período. É importante observar que dentre as concentrações investigadas, as mais elevadas (40 a 50 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram uma redução na concentração (degradação) a partir das 24 h, podendo ser algum mecanismo decorrente da formação de grumos que pode ocorrer com muitas espécies orgânicas em altas concentrações.

Gráfico 6 - Concentração de íons xantato em função do tempo dos estudos



Fonte: Autoria própria, 2015.

Além disso, é importante enfatizar que o pH esteve na faixa de 7,18 – 8,48, mostrando que a degradação do isopropil xantato de sódio não foi decorrente do pH, pois de acordo com SILVA *et al.* (2014), a estabilidade dos íons xantato em função

do pH, ocorre em meio ácido (abaixo de 7,0), sendo este composto totalmente degradado em 24 horas em pH 3,0.

Este resultado também é importante para justificar o uso da metodologia de análise da CL50 (seção 4.2.3), pois não houve degradação superior à 20% da substância química utilizada neste estudo.

## 6 CONCLUSÕES

A exposição ao isopropil xantato de sódio alterou o metabolismo de carboidratos do *D. rerio*, aumentando os níveis de glicose e lactato.

A CL50 (48h) do reagente isopropil xantato de sódio para o *Danio rerio* foi estimada em 23 mg L<sup>-1</sup> (IC 95%).

O jejum alterou o metabolismo de carboidratos do *D.rerio*, reduzindo o nível de glicose.

O isopropil xantato de sódio em diferentes concentrações não provocou alterações nas características da água de abastecimento.

O isopropil xantato de sódio é estável, mantendo, pelo menos, 80% da concentração durante os estudos.

## REFERÊNCIAS

- ALURU, N.; RENAUD, R.; LEATHERLAND, J.F.; VIJAYAN, M.M. Ah receptor-media ted impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout. **Toxicol. Sci.** v.84, p.260-269, 2005.
- APHA: Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. **Washington**, AWWA; WEF, 2012.
- ARUNACHALAM, M.; RAJA, M.; VIJAYAKUMAR, C.; MALAIAMMAL, P.; MAYDEN, R. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. In: Zebrafish. **Mary Ann Liebert Inc. publishers**, V.10, n.1, 2013.
- ASHOURI, G.; YAVARI, V.; BAHMANI, M.; YAZDANI, M.A.; KAZEMI, R.; MORSHEDI, V.; ESLAMLO, K. Cortisol and metabolites in juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt, 1869 in response to short-term food deprivation. **Caspian J. Env. Sciences**. V. 12, n.1, p. 41-52, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, 2011.
- BALTAR, C.A.M. **Flotação no Tratamento de Minérios**. Recife: Departamento de Engenharia de Minas/UFPE, 2008.
- BARBAZUK, K.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, A.; MCPHERSON, J.D.; Johnson, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res.** 10: 1351-1358, 2000.
- BARCELLOS, L.J.G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R.M.; FERREIRA, D. The effects of fasting cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Ramdia quelen*. **Aquaculture**. Elsevier, 300, p. 231-236, 2010.
- \_\_\_\_\_; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Ramdia quelen*, *Quoy & Gaimard*, *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquacul. Res.** 34, p.1465-1469, 2003.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Rev. Fish Dis.**, v.1, p.3-26, 1991.
- BAUNGARTNE, L. L.; Wolf, B. Sodium Isopropyl Xanthate as a Selective Herbicid. **Contribs. Boyce, Thomrson Inst**, 15, p. 403-9, 1964.

BILBERG, K.; HOVGAARD, M.B.; BESENBACHER, F.; BAATRUP, E. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Toxicology**. Hindawi Publis. Corporat. 2012.

BLACK, D.; LOVE, R.M. The sequential mobilization and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. **J. Comp. Physiol.** 156, Part B: 469-479, 1986.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente — CONAMA. Resolução nº 357, Brasília, 17 de março. **DOU nº 53**, p. 58, 18 de março, 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente — CONAMA. Resolução nº 410, Brasília, 04 de maio. **DOU nº 83**, p. 106, 05 de maio, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente — CONAMA. Resolução nº 430, Brasília, 13 de maio. **DOU nº 92**, p. 89, 16 de maio, 2011.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, Brasília, 12 de dezembro, 2011.

BRENTANO, D. M.; **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna***: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BREMMELL, K.E.; JAMESON, G.J.; BIGGS, S. “Adsorption of ionic surfactants in particulate systems: flotation, stability, and interaction forces. *Coloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol.146, p.75-87, 1999.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Scien. Total Environ.**, v. 247, p. 201-212, 2000.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J.F.Jr. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje** 31 (182): 68-71, 2002.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica metabólica**. São Paulo, Ed. Thomson, 5 ed., 2008.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L.J.G. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in

vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 149, 363-367, 2009.

CYTEC. Disponível em: <[www.cytec.com/businesses/in-process-separation/mining-chemicals/brands/aero](http://www.cytec.com/businesses/in-process-separation/mining-chemicals/brands/aero)> Acesso em: 10 de Janeiro, 2015.

CHAMPAGNE, D.L.; HOEFNAGEL, C.; KLOET, R.E.; RICHARDSON, M.K. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, Volume 214, Issue 2, Pages 332-342, 2010.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 4 ed., 2009.

CARRASCHI, S.P.; CUBO, P.; SCHIAVETTI, B.L.; SHIOGIRI, S.; CRUZ, C.; PITELLI, R.A. Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. V.33, n.2, p.191-196, Maringá, 2011.

CARUSO, G.; DENARO, M.G.; CARUSO, R.; GENOVESE, L.; MANCARI, F.; MARICCHIOLO, G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, *Linnaeus 1758*): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. **Marine Environmental Reserche**. Elsevier, 18, p. 18-25, 2012.

CHASIN, A. A. M.; PEDROZO, M.F. M. O estudo da toxicologia. In: Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 340p., 2003.

CHAVES, A.P.; LEAL-FILHO, L.S. BRAGA, P.F. **Flotação**. Em: Tratamento de Minérios - CETEM, Capítulo 11, Ed.5, Editores: Luz, A.B.; Sampaio, J.A.; Almeida, S.L.M., Rio de Janeiro, 2010.

CHOCKALINGAM, E.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, A.K. Studies on biodegradation of organic flotation collectors using *Basillus polymyxa*. **Hidrometallurgy**. V.71, p.249-256, 2003.

CONNELL, D.W.; MILLER, G.J. Chemistry and ecotoxicology of pollution. **John Wiley & Sons**: New York, 1984.

COOK, J.T. et al. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**. 188: 47-63, 2000.

CRESTANI, M. Efeitos do herbicida clomazone sobre parâmetros metabólicos e antioxidantes em jundiás (*Rhamdia quelen*). 95 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)** – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria, RS, 2004.

\_\_\_\_\_; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, S.D.; LAZZARI, R.; DUARTE, F.M.; MORSH, M.V.; PIPPI, L.A.; VIEIRA, P.V. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicolog. Environ.** 65: 48-55, 2006.

DAMMSKI, A.; MULLER, B.R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebra Fish: Manual de Criação em Biotério**. Universidade Federal do Paraná. Ed. 1. Curitiba, 2011.

DORNFELD, C.B. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, 2002.

EGAN, R.J.; BERGNER, C.L.; HART, P.C.; CACHAT, J.M.; CANAVELLO, P.R.; ELEGANT, M.F.; ELKHAYAT, S.I.; BARTELS, B.K.; TIEN, A.K.; Tien, D.H.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A.V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav. Brain Res.** 205(1):38-44, 2009.

ESPINDOLA, E.L.G. Impactos ambientais em recursos hídricos : causas e conseqüências. São Carlos: RiMa Editora, p.245-259, 2001.

SVOBODOVÁ, Z.; LLOYD, R.; MÁCHOVÁ, J.; VYKUSOVÁ, B. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Water quality and fish health*. EIFAC Technical Paper, n.54, Rome, p.59, 1993.

FERNANDES, F.R.C.; LUZ, A.B.; MATOS, G.M.; CASTILHOS, Z. Tendências Tecnológicas Brasil 2015: **Geociências e Tecnologia Mineral - Rio de Janeiro: CETEM/MCT**, 2007.

FERRARI, B.; MONS, R.; VOLLAT, B.; FRAYSSE, B.; PAXEUS, N.; LO GIUDICE, R.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environental Toxicology and Chemistry**, 23, 1344–1354, 2004.

FONSECA, M.D.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; PRETTO, A.; TIerno, M.A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F.F.; LORO, V.L. 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.9, p.416-420, 2008.

FONTAINE, E.; LENTINK, D.; KRANENBARG, S.; MÜLLER, U.K.; VAN LEEUWEN, J. L.; BARR, A.; BURDICK, J. W. Automated visual tracking for studying the ontogeny of zebrafish swimming. **The Journal of Experimental Biology**. 211, 1305-1316, 2008.

FUERSTENAU, M. C. The Toxicity of Selected Sulfhydryl Collectors to Rainbow Trout. **Bureau of Mines Open File Report** 11-75. 28 p., 1974.

\_\_\_\_\_; Flotation. A. M. Gaudin Memorial. **American Institute of Mining, Metallurgical, and Petroleum Engineers**, Inc. New York. v. 1, v. 2, 1976.

FURNÉ, M.; MORALES, A.E.; TRENZADO, C.E.; GARCÍA-GALLEGO M.; HIDALGO, M.C.; DOMEZAIN, A.; SANZ, A. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **J. Comp. Physiol.** 18 2B, 63–76, 2012.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M.B.; PEDRON, F.A.; DUARTE, M. F. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 65: 237-241, 2006.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano II, n. 1, 2003.

HAO, F; BRUCKARD, W.J.; DAVEY, K.J.; WOODCOCK, J.T. Online analysis for xanthate in laboratory flotation pulps with a UV monitor. **Int. J. Miner. Process**, 89, 71-75, 2008.

HAWLEY, J.R. The Use, Characteristics and Toxicity of Mine-mill Reagents in the Province of Ontario. **Ministry of the Environment, Ontario**, p.95, 1972.

HARRIS, H.G. Reagents in mineral technology. Xanthates, **Surfactant science series**, V. 27, New York, 11, 371-383, 1988.

HARRIS, R.A. Metabolismo de carboidratos I: Principais vias metabólicas e seu controle, cap.15. Em: **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. Edit. Thomas M. Devlin, 6ª ed., Ed. Edgar Blucher LTDA, São Paulo, 2007.

HILL, A.J., HOWARD, C.V., COSSINS, A.R. Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: Zebrafish larvae. **J. Microsc.** 206, 179–18, 2002.

\_\_\_\_\_ ; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, 86(1), 6–19, 2005.

HOCHACHKA, P.W.; SINCLAIR, A.C. Glycogen stores in trout tissues before and after stream planting. **Fisheries Research Board Journal**. Canada, 19, 127-136, 1962.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.17, p. 44-48, 1998.

HORNICK, J.L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. **Domestic Animal Endocrinology**. 19, 121-132, 2000.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall. p. 309, 1994.

KING, P.R.. Principles of Flotation. **Institute of Mining and Metallurgy**. Johannesburg, 1982.

LEAL FILHO, L. S. Concentração por Flotação. Escola Politécnica da USP, **Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mineral**, São Paulo, 1995.

LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**. 14. (1), 57-72, 1996.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MATIAS, W. G. Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro. 183p. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental). Universite de Bordeaux, Bordeaux, França. 1996.

MECHI, A.; SANCHES, D.L. Impactos ambientais da mineração no estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, 24 (68), 2010.

MENDES, C. J. Caracterização dos efluentes líquidos em termos de ecotoxicidade gerados na disposição de RSU nos "aterros" do entorno de Criciúma – SC. 2004. Monografia (Curso de Engenharia Ambiental). UNESC, Criciúma, 2004.

MIRON, D.S. Respostas metabólicas e enzimáticas em jundiás *Rhamdia quelen* (heptapteridae) e piavas *Leporinus obtusidens* (anostomidae) expostos a herbicidas utilizados na cultura do arroz irrigado. **Dissertação (Doutorado em Bioquímica Toxicológica)** – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria, RS, 2009.

MÖLLERKE, R.O. et al. Níveis de arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do lago Guaíba em Porto Alegre RS-Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 117-121, 2003.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN M.M.; MOON T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v.9, p. 211-268, 1999.

MORAES, G.; BIDINOTTO, PM. Induced changes in the amylohydrolytic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrate: its correlation with metabolic aspect. **Revista de Ictiologia** 8, 47-51, 2000.

MORATA, P. A. M.; VARGAS, F.; SANCHEZ-MEDINA, M.; GARCIA, G.; CARDENETE, AND S. ZAMORA. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 7, 65-70, 1982.

NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fasting and starvation. In: Hochachka P.W., Mommsen T.P. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier, Amsterdam, p. 393–434, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed**, Porto Alegre, 5 ed., 2011.

NEWGARD, C.B. et al. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? **J. Biol.Chem.** 258, 13: 8046-8052, 1983.

OLIVEIRA, C.R.; RUBIO, J. New basis for adsorption of ionic pollutants onto modified zeolites. **Minerals Engineering**, 2007.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Isopropylxanthate ions uptake by modified natural zeolite and removal by dissolved air flotation. **Intern. Journal of Mineral Processing.** , v.90, p.21-26, 2009.

OLIVEIRA—FILHO, E.C.; SISINO, C.L.S. In: Princípios de Toxicologia Ambiental: conceitos e aplicações. Cap. 1 e 2, Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2013.

OLIVI, P.; COSTA, C.R.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e método de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, N° 7, p. 1820-1830, 2008.

ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of Cyp rinuscarpio. **Environmental Pollution**, v. 105, p. 267-272, 1999.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSOU, A-M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J.F.; GRAND, C.; BISPO, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Sci. Total Environ.** v.363, p.114-125, 2006.

PEARSE, J.M. An overview of the use of chemical reagents in mineral processing. **Minerals Engineering**. v. 18, p. 139-149, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A., GUEDES, M.J.; MORALES, A.E.; OLIVA-TELES, A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture**. 265, 325–335, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; CARDENETE, G.; HIDALGO, M.C.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABELLÁN, E.; MORALES, A. E. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. **Fish Physiol. Biochem.** Springer Science, 38, 1145-1157, 2012.

PENHA, F.G.; SPIER, V.C.; DEBACHER, N.A. Adsorção de xantatos sobre pirita. **Química Nova**. v. 24, n. 5, p. 612-615, 2001.

PIATO, A.; CAPIOTTI, K. ; TAMBORSKI, A.R.; OSES, J.P.; BARCELLOS, L.J.G.; BOGO, M.R.; LARA, D.R.; VIANNA, M.; BONAN, C.D. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 35: 561–567, 2010.

KREUTZ, C.L.. BARCELLOS, G.J.L.; SILVA, O.T.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, B.L. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v.38, p.1050-1055, 2008.

RAHAMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanism involved in hyperglycemia induced by organosphosphorus pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.88, p.115-121, 2007.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology. **Washington**, 665 p., 1985.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. 2nd ed., **Taylor & Francis: Washington**, cap. 1, 1995.

RAMÍREZ, B.; ESCUDERO, R.; TAVERA, J.F.. Decomposición del ion xantato y su caracterización mediante la técnica de espectrofotometría ultravioleta de luz visible. **Memórias del XVI Congresso Internacional de Metalurgia Extractiva “Dr Manuel Méndez Nonell”** In Memoriam. Saltillo, Coahuila, 2006.

RIBEIRO, P.A.P.; MELO, D.C.; COSTA, L.S.; TEIXEIRA, E.A. **Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012.

RESGALLA JR, C.; NOLDIN J.A.; SANTOS, A.L.; SATO G.; EBERHARDT, D.S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 12: 59-68, 2002.

RIBO, J.M. Environmental Toxicology. **Water Qual**. 12, 283, 1997.

RIO GRANDE DO SUL, Resolução nº 129 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul - CONSEMA, de 24 de novembro de 2006.

RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, intercalibración, resultados y Aplicaciones. **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa**, cap. 3., 2004.

RUBIO, J.; OLIVEIRA, C., SILVA, R. Aspectos Ambientais nos Setores Mineiro e Metalúrgico. Em: **Tratamento de Minérios** - CETEM, Capítulo 17, Ed.5, Editores: Luz, A.B.; Sampaio, J.A.; Almeida, S.L.M., Rio de Janeiro, 2010.

SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; GAMON, M.; ANDREAU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla Anguilla* after exposure of fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 168-175, 1998.

SEIBT, K.J.; OILIVEIRA, R.L.; ZIMMERMANN, F.F.; CAPIOTTI, K.M.; BOGO, M.R.; GHISLENI, G.; BONAN, C.D. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**. Vol. 214, Issue 2, Pages 417–422, 2010.

SEIXAS FILHO, J.T. Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. **Augustus**, Rio de Janeiro, Centro Universitário Augusto Motta, v. 9, n. 18, p. 1-72, 2004.

SHERIDAN, M.A.; MOMMSEN, T.P. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 81, 473–483, 1991.

SILVA, M.S.; MOTA, C.S.; RODRIGUES, C.O. Avaliação da estabilidade química de íons xantato em meios aquosos ácidos e alcalinos. Resumo X Semana Científica do Unilasalle. Canoas, 2014.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.P. TEIXEIRA, J.M.S.; MILÉSKI, K.M.L.; HANSEN, P.C.; MOELLER, P.R.; MOREIRA, P.S.A.; BAVIERA, A.M.; LORO, V.L. Metabolic and behavior changes in Surubim acutely exposed to a Glyphosate-based herbicide. **Arch. Environ. Contam. Toxicology**. 2014.

SPENCE, R., G. GERLACH, C. LAWRENCE, C. S. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, 83: 13-34, 2008.

SPITSBERGEN, J.M.; KENT, M.L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. **Toxicol. Pathol.** 31, (Suppl.), 62–87, 2003.

SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Can. J. Zool.** 65: 1869-1882, 1987.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1: 151-173, New York, 1977.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxic. Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

WANG, X.; FORSSBEERG, K. Mechanisms of pyrite flotation with xanthates. **International Journal of Mineral Processing**. v. 33, p. 275-290, 1991.

WEATHERLEY, A.H.; GILL H.S. Dynamics of muscle growth in fish. **The Biology of Fish Growth**. Academic Press, Inc., 150-161, 1987.

WEIL, L.; BARRY, T.; MALISON, J. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. **Aquaculture**, v.193, p.373-380, 2001.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, v.77, p. 591-625, 1997.

WESTERFIELD M. **The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*)**. 4th edition OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, Eugene, 2000.

WILSON, J.M.; BUNTE, R.M.; CARTY, A.J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **J.A. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, 48: 785-789, 2009.

WHO. Carbon disulfide. Air quality guidelines. Chapter 5.4, Second Ed., **World Health Organization Regional Office for Europe**, Copenhagen, Denmark, 2000.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey: **Prentice Hall**, 800 p., 1996.

ZEPPENFELD, C.C.; TONI, C.; BECKER, A.G.; MIRON, D.S.; PARODI, T.V.; HEINZMANN, B.M.; BARCELLOS, L.J.G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; LORO, V.L.; CUNHA, M.A.; BALDISSEROTTO, B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla*. **Aquaculture**, 418-419, p. 101-107, 2014.

ZUCKER, E. Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish. **U.S.EPA – Environmental Protection Agency, national library catalog publication 540/9-85-006**, Washington D.C., p.17, 1985. Disponível em: <[www.epa.gov](http://www.epa.gov)>. Acesso em: 08 de dezembro de 2014.