

DIÊGO ALBERTO TEODORO

**TOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO DE
Oreochromis niloticus AO EFLUENTE DE CURTUME:
EFEITOS COMPORTAMENTAIS, BIOMÉTRICOS E
MUTAGÊNICOS**

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

DIÊGO ALBERTO TEODORO

TOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPSIÇÃO DE *Oreochromis niloticus* AO EFLUENTE DE CURTUME: EFEITOS COMPORTAMENTAIS, BIOMÉTRICOS E MUTAGÊNICOS

Orientador

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

T314t Teodoro, Diêgo Alberto.

Toxicidade induzida pela exposição de *Oreochromis niloticus* ao efluente de curtume: efeitos comportamentais, biométricos e mutagênicos / Campus Urutaí. [manuscrito] / Diêgo Alberto Teodoro. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.

65 fls.

Orientador: Dr. André Luis da Silva Castro

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. *Meio ambiente*. 2. Poluição. 3. Biomarcadores. 4. Peixes.
5. Metais Pesados. I. Título.

CDU 57



FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	Toxicidade induzida pela exposição de <i>Oreochromis niloticus</i> ao efluente de curtição: efeitos comportamentais, biométricos e mutagênicos
Orientador:	Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
Autor:	Diêgo Alberto Teodoro

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 19 de fevereiro de 2018, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir.

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente

Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia
Membro titular

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, amigos e colegas de curso que sempre me apoiaram. Dedico, também, aos meus colegas do laboratório de Zoologia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por tudo de bom que sempre fez em minha vida, pelos dons que me foram atribuídos e por estar sempre ao meu lado.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí e aos seus colaboradores pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade.

Ao professor Dr. André Luis da Silva Castro pela valiosa orientação e por sempre me apoiar.

A todos os professores do PPG-CRENAC que contribuíram para minha formação e me proporcionaram grande aprendizagem.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da bolsa de mestrado, que foi um auxílio imprescindível para o desenvolvimento do meu projeto durante o mestrado.

A todos da minha família, em especial meu pai Carlos Lázaro Teodoro, minha mãe Ana Maria Gonçalves Teodoro e meu irmão Carlos Henrique Teodoro, por todo carinho, apoio e incentivo durante esta jornada.

A todos os meus companheiros e amigos do Laboratório de Zoologia/ IF Goiano - Campus Urutaí, em especial à Caroliny Fátima Chaves da Paixão, Amanda Pereira da Costa Araújo, Marcelo Vieira Cardoso e Thales Quintão Chagas, que contribuíram para que a realização deste estudo fosse possível.

Aos amigos que tive oportunidade de conhecer durante o curso, que sempre me motivaram, apoiaram e me ajudaram.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha formação. Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
APRESENTAÇÃO.....	x

CAPÍTULO 1- IMPACTOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E COMPORTAMENTAIS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	02
2.1. Animais	02
2.2. Efluente de curtume, concentrações ambientais e diluições usadas	03
2.3. Análises dos parâmetros biométricos	04
2.4. Análises dos parâmetros comportamentais	05
2.5. Análises estatísticas.....	06
2.6. Questões éticas	06
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	06
4. CONCLUSÃO	14
5.REFERÊNCIAS	15

CAPÍTULO 2- EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Animais	21
2.2. Efluente de curtume, concentrações ambientais e concentrações utilizadas	21
2.3. Análises dos parâmetros biométricos	23
2.4. Análises dos parâmetros comportamentais	24

2.5. Teste de danos ao núcleo celular (Testes mutagênicos)	25
2.6. Análises estatísticas.....	25
2.7. Questões éticas	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
CONCLUSÃO GERAL	44

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- IMPACTOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E COMPORTAMENTAIS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME

- Figura 1-** Esquema da duração do experimento e filmagens para análises comportamentais da exposição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a efluente de curtume.05
- Figura 2-** Efeitos do efluente de curtume sobre o ganho de peso (A) e crescimento (B) da tilápia-do-Nilo exposta ao contaminante por 96 horas.07
- Figura 3-** Índice Hepatosomático de *Oreochromis niloticus* exposta ao efluente de curtume por 96 horas.....08
- Figura 4-** Latência para alimentação de *Oreochromis niloticus* exposta a diferentes concentrações de efluente de curtume por 96 horas..09
- Figura 5-** Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* ao efluente de curtume por 5 dias sobre a distância percorrida (A) e o tempo em movimentação (B)..11
- Figura 6-** Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* a diferentes concentrações de efluente por 5 dias sobre a latência para atacar espelho (A) e sobre a frequência de ataques ao espelho. Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias, de acordo com o teste LSD.....12
- Figura 7-** Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* a diferentes concentrações de efluente sobre a frequência de ondulações (A) e sobre a frequência de ataques totais (B). Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias, de acordo com o teste de média LSD.13

Capítulo 2- EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

- Figura 1-** Esquema da duração do experimento e filmagens para análises comportamentais da exposição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a efluente de curtume.....24
- Figura 2-** Efeitos do efluente de curtume sobre o ganho de peso (A) e crescimento (B) da tilápia-do-Nilo exposta ao efluente de curtume por 96 horas.....26
- Figura 3-** Índice Hepatosomático de *Oreochromis niloticus* exposta ao efluente de curtume por 96 horas27
- Figura 4-** Latência para alimentação de *Oreochromis niloticus* exposta a diferentes concentrações de efluente de curtume por 96 horas..28
- Figura 5-** Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* ao efluente de curtume sobre a distância percorrida (A) e o tempo em movimentação (B)..30
- Figura 6-** Teste do objeto estranho em *Oreochromis niloticus* exposta por 5 dias a concentrações de efluente de curtume. Latência para se aproximar do objeto estranho (A) e tempo que os peixes passaram perto do objeto estranho (B). Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias.32
- Figura 7-** Anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*: Eritrócito com núcleo normal (A). Núcleo com broto (B). Célula binucleada (C). Núcleo lobulado (D). Núcleo entalhado (E). Núcleo deslocado (F). Núcleo riniforme (G). Micronúcleo (H)..33
- Figura 8-** Frequência de anormalidades nucleares totais de *Oreochromis niloticus* dos grupos expostos ao efluente de curtume por 96 horas e dos grupos controle negativo e positivo (A). Frequência de núcleos com broto nos diferentes grupos testados (B). Frequência de células binucleadas (C). Frequência de núcleos lobulados (D) (Média \pm DP).35
- Figura 9-** Frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* nos grupos expostos e não expostos ao efluente de curtume por 96 horas. Frequência de núcleos entalhados (A). Frequência de núcleos deslocados (B). Frequência de núcleos riniformes (C). Frequência de micronúcleos (D) (Média \pm DP).38

RESUMO GERAL

O meio ambiente sofre impactos constantes causados pelas ações antrópicas. O desenvolvimento acelerado dos meios de produção e a ausência de consciência ambiental tem levado à degradação dos recursos naturais. Um dos recursos naturais mais prejudicados atualmente são os recursos hídricos. A poluição é a principal causa dos danos aos ecossistemas aquáticos, sendo que os efluentes industriais são as principais fontes de contaminantes. Neste cenário, as indústrias de curtume se destacam, uma vez que a produção de couro gera um efluente altamente tóxico, devido aos seus componentes orgânicos e não-orgânicos, como os metais pesados. Desta maneira, o efluente de curtume pode causar danos ambientais e prejudicar a saúde e sobrevivência dos organismos expostos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de efluente de curtume do tipo *wet blue* em parâmetros biométricos (crescimento, ganho de peso e Índice Hepatosomático- IHS), comportamentais (alimentação, movimentação, agressividade e resposta ao objeto estranho) e mutagênicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram realizados dois experimentos: no experimento 1, os peixes foram expostos às concentrações de 2,5% (0,005%) e 25% (0,05%) da concentração ambiental estimada (0,2%). Neste estudo, a tilápia-do-Nilo foi exposta por um período de 96 horas e foram avaliados o efeito da exposição ao efluente de curtume nos parâmetros biométricos e comportamentais. Já no experimento 2, a tilápia-do-Nilo foi exposta às concentrações de 50% (0,1%) e 100% (0,2%) da concentração ambiental estimada do efluente de curtume por 96 horas e foram avaliados os efeitos biométricos, comportamentais e mutagênicos. No experimento 1 o efluente de curtume causou aumento do IHS e da agressividade nos peixes expostos ao poluente, sem alterar os outros parâmetros avaliados. No experimento 2 o efluente de curtume causou alteração na resposta a objeto estranho e aumento das frequências de anormalidades nucleares e micronúcleo nos peixes expostos. Concluiu-se que o efluente de curtume, mesmo em concentrações abaixo da concentração ambiental estimada, apresenta toxicidade para a tilápia-do-Nilo e causa danos biométricos, comportamentais e mutagênicos, o que pode implicar em prejuízos ecológicos na sobrevivência e reprodução dos peixes.

Palavras-chave: Recursos hídricos; Meio ambiente; Poluição; Ecotoxicologia; Peixes.

GENERAL ABSTRACT

The environment is constantly impacted by human actions. The rapid development of the means of production and the lack of environmental awareness have led to the degradation of natural resources. One of the most impaired natural resources today is water resources. Pollution is the main cause of damage to aquatic ecosystems, with industrial effluents being the main source of contaminants. In this scenario, the tanning industries stand out, since the production of leather generates a highly toxic effluent due to its organic and non-organic components, such as heavy metals. In this way, the tanning effluent can cause environmental damage and impair the health and survival of exposed organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of exposure to different concentrations of wet blue effluent on biometric parameters (growth, weight gain and Hepatosomatic Index - IHS), behavioral (feeding, movement, aggressiveness and response to the object strange) and mutagenic from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Two experiments were carried out: in experiment 1, fish were exposed to concentrations of 2.5% (0.005%) and 25% (0.05%) of the estimated environmental concentration (0.2%). In this study, Nile tilapia was exposed for a period of 96 hours and the effect of exposure to tannery effluent on biometric and behavioral parameters was evaluated. In the experiment 2, Nile tilapia was exposed to concentrations of 50% (0.1%) and 100% (0.2%) of the estimated environmental concentration of the tanning effluent for 96 hours and the biometric effects, behavioral and mutagenic. In the experiment 1 the tanning effluent caused an increase in IHS and aggressiveness in the fish exposed to the pollutant, without altering the other parameters evaluated. In the experiment 2 the tannery effluent married alteration in the foreign object response and increased frequencies of nuclear and micronuclei abnormalities in exposed fish. It was concluded that tannery effluent, even at concentrations below the estimated environmental concentration, presents toxicity to Nile tilapia and causes biometric, behavioral and mutagenic damages, which may imply ecological damages in fish survival and reproduction.

Keywords: Water resources; Environment; Pollution; Ecotoxicology; Fish.

APRESENTAÇÃO

Os ecossistemas são impactados diariamente pela poluição, sendo que os efluentes de origem industrial são as principais fontes poluidoras. As indústrias de curtume geram um efluente tóxico, rico em metais pesados e compostos orgânicos os quais são lançados nos corpos hídricos e comprometer organismos que dependem de tais recursos. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos que o complexo efluente de curtume pode causar em organismos aquáticos, como os peixes. O estudo consistiu em avaliar os impactos do efluente de curtume do tipo *wet blue* nos aspectos biométricos, comportamentais e mutagênicos da tilápia-do-Nilo. O estudo foi dividido em dois capítulos.

No capítulo 1 as tilápias-do-Nilo foram expostas a concentrações de efluente menores do que aquela estimada para o meio ambiente. Foram analisados os efeitos da exposição a esse contaminante por 5 dias no crescimento, ganho de peso, IHS, comportamento alimentar, movimentação e comportamentos agonístico. Já no capítulo 2 as tilápias foram expostas a concentração ambiental estimada e a uma concentração que representa a metade da concentração ambiental estimada do efluente de curtume. Neste experimento também foram avaliados os efeitos da exposição ao efluente de curtume por 5 dias nos parâmetros biométricos da tilápia-do-Nilo. Neste experimento foi avaliada a capacidade de os peixes explorarem e se habituarem à presença de um objeto estranho, frente à exposição a um poluente. Além disso, foi avaliada a capacidade do efluente de curtume em causar danos mutagênicos na tilápia-do-Nilo.

IMPACTOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E COMPORTAMENTAIS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME

RESUMO

A indústria de couro contribui para o desenvolvimento econômico de países em desenvolvimento, como o Brasil. Porém, a fabricação de couro gera uma grande quantidade de resíduos tóxicos, que podem causar diversos danos ambientais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao efluente de curtume do tipo *wet blue* nos parâmetros biométricos e comportamentais da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a exposição por 5 dias ao poluente. Foram formados três grupos com 13 peixes cada grupo: grupo controle (0%), grupo de exposição I (2,5% da concentração ambiental estimada), grupo de exposição II (25% da concentração ambiental estimada). Os animais foram medidos e pesados no início e no final do experimento. Os peixes foram mantidos individualmente em aquários e foram filmados no dia 1 (0 h), dia 3 (48 h) e dia 5 (96 h) do experimento para as análises comportamentais. Foi observado o aumento no Índice Hepatosomático nos peixes expostos ao efluente de curtume. Porém, não houve alterações no crescimento e no ganho de peso. O efluente de curtume não alterou o comportamento alimentar e não afetou a capacidade de movimentação da tilápias-do-Nilo. Entretanto, houve um aumento significativo na agressividade dos peixes expostos ao efluente de curtume em relação aos peixes do controle. Portanto, concluiu-se que o efluente de curtume do tipo *wet blue* pode causar alterações sobre parâmetros biométricos e comportamentais na tilápias-do-Nilo.

Palavras-chave: Meio ambiente; Poluição; Comportamento; Peixes

IMPACTS ON BIOMETRIC AND BEHAVIORAL PARAMETERS OF NILE-TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CAUSED BY EXPOSURE TO THE EFFLUENT OF TANNERY

ABSTRACT

An industry of contributions to the economic development of developing countries, such as Brazil. However, a leather manufacture generates a large amount of toxic waste, which can cause various environmental damages. Thus, the objective of the present study was to evaluate the biologic and behavioral parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), during a 5-day period, to evaluate the effects of exposure to wet blue effluent. Three groups were formed with 13 fish each group: control group (0%), exposure group I (2.5% of estimated environmental concentration), exposure group II (25% of estimated environmental concentration). The animals were measured and weighed at the beginning and no end of the experiment. The fish were kept individually in aquariums and as many films as day 1 (0 h), day 3 (48 h) and day 5 (96 h) of the experiment for the behavioral analyzes. The increase in the Hepatosomatic Index was observed in the fish exposed to the tannery effluent. However, there was no growth and no weight gain. The tanning effluent did not alter the feeding behavior and did not affect the Nile tilapia movement capacity. There is a significant increase in the aggressiveness of the fish exposed to the tannery effluent in relation to the control fish. Thus, it was concluded that the tanning effluent of the wet blue type can cause on the biometric and behavioral parameters in the Nile tilapia.

Keywords: Environment; Pollution; Behavior; Fish

1. INTRODUÇÃO

A indústria de couro no Brasil tem grande importância na economia nacional, uma vez que o país é o 4º maior exportador de couro do mundo e contribui com 13% da demanda internacional deste produto (ESCOBAR, 2014). Estima-se que no Brasil há cerca de 310 indústrias de curtume em diferentes estados brasileiros (PRADO et al., 2013), sendo que só em 2017 essas indústrias, em todo o país processaram 202,3 milhões de metros quadrados de peles bovinas, arrecadando US\$1,9 bilhões com a exportação desse produto (CICB, 2017).

Apesar da importância econômica da indústria de processamento de pele bovina, essa atividade industrial depende de processos mecânicos e químicos para o tratamento das peles, os quais geram grandes quantidades de resíduos com concentrações elevadas de produtos químicos potencialmente tóxicos, tais como cromo, cádmio, níquel e chumbo (GODECK et al., 2012). Assim, a destinação inadequada ou sem tratamento dos efluentes e dos resíduos do curtume implicam no risco de contaminação ambiental e prejuízos para a saúde das populações expostas direta ou indiretamente a esses resíduos (GANEM, 2007; GODECK et al., 2012), envolvendo organismos aquáticos, terrestres e seres humanos.

O Brasil é um país privilegiado em se tratando de recursos hídricos, sendo que o bioma do Cerrado tem grande importância para a abundância desse recurso, uma vez que o Cerrado possui diversas nascentes e rios que contribuem para a formação e abastecimento de seis bacias hidrográficas brasileiras (LIMA; SILVA, 2005). Entretanto, as atividades humanas, como a produção de couro, podem contaminar esses corpos hídricos, inviabilizando-os para o uso humano e prejudicando os organismos que vivem ou dependem dos meios aquáticos (GANEM, 2007; GODECK et al., 2012). A contaminação dos meios aquáticos por efluente de curtume (EC) foi demonstrado pelo estudo realizado por Jordão et al. (1999), em que os autores constataram que rios de Minas Gerais que recebiam EC continham elevados níveis de cromo, sendo que em um rio analisado apresentou nível de cromo 656 vezes acima do limite estabelecido pela legislação brasileira do CONAMA.

Esses dados são alarmantes quando se trata da região Centro-Oeste (região cujo bioma predominante é o Cerrado), pois em um estudo realizado em 310 curtumes do Brasil foi identificado que 20% das empresas curtumeiras localizadas nessa região não têm controle sobre o efluente gerado (PRADO et al., 2013). Outro agravante que pode comprometer ainda mais a conservação dos recursos hídricos do Cerrado é o deslocamento das empresas das regiões do

Sul e Sudeste para o Centro-Oeste, devido ao deslocamento da criação bovina para essa região (CORREA & ROSA, 2007; CÂMARA & GONÇALVES-FILHO, 2007).

Frente a estes impactos ambientais, algumas pesquisas têm buscado avaliar os efeitos dos ECs em diferentes ambientes e organismos (JORDÃO et al., 1999; RODRIGUES & FORMOSO, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; MOYSÉS et al., 2014; WALIA et al., 2015). Entre os estudos que testaram os efeitos biológicos da exposição à efluente de curtume destacam-se os que utilizaram espécies de peixes, uma vez que estes organismos são considerados bons modelos para estudos de toxicidade ambiental (BOLIS et al., 2001) e estão propensos à contaminação direta a partir de lançamentos de poluentes nos ecossistemas aquáticos (GBEM et al., 2001).

Alguns dos efeitos conhecidos dos efluentes de curtume em diferentes espécies de peixes são imunotóxicos (MURUGESAN et al., 2012), mutagênicos e genotóxicos (MATSUMOTO et al., 2006; WALIA et al., 2015), efeitos hematológicos e efeitos sobre índice de crescimento (GBEM et al., 2003). Entretanto, são necessários mais estudos para compreender melhor os efeitos do efluente de curtume sobre parâmetros comportamentais e índices biométricos dos peixes, uma vez que as informações sobre os impactos da exposição ao efluente de curtume sobre estes parâmetros em peixes são escassas.

Ademais, uma mesma substância pode apresentar variação de toxicidade em espécies diferentes de vertebrados, o que torna imprescindível que mais estudos sejam realizados com espécies diferentes para ter maior conhecimento e melhor compreensão sobre as consequências da contaminação de determinadas substâncias na biota aquática (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015). Portanto, o uso de organismos aquáticos, como os peixes, representa importantes ferramentas em estudos de ecotoxicologia, podendo ser útil para a avaliação da qualidade de corpos hídricos, para conhecer os riscos que determinadas substâncias podem causar aos organismos e para questionar os limites permissíveis de lançamento de efluentes em corpos hídricos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do EC do tipo *wet blue* nos parâmetros biométricos e comportamentais da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), após a exposição por 96 horas. A hipótese inicial foi de que o EC iria causar efeitos nos parâmetros biométricos e causar alterações comportamentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizadas tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), sem distinção de sexo, com comprimento total médio de $12,1 \pm 0,94$ cm e biomassa corpórea médio de $32,18 \pm 5,95$ g,

obtidas no setor de piscicultura do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (Goiás, Brasil). Os animais foram aclimatados por um período de 15 dias antes da realização dos experimentos, com exposição ao fotoperíodo natural (12:12). Neste período, os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial para peixes (28% de proteína bruta).

2.2. Efluente de curtume, concentrações ambientais e diluições usadas

O efluente utilizado foi proveniente de uma indústria curtumeira localizada no município de Inhumas (Goiás, Brasil). Montalvão et al. (2018), utilizando dados de quantidade de pele processada em uma indústria curtumeira e a vazão do corpo d'água onde o efluente é descartado (ilegalmente), estimaram a concentração de efluente no ambiente em 0,2%. (Equação utilizada por Montalvão et al. 2018: $ECRB = [E_f / (E_f + W_f)]$, em que ECRB = Concentração de efluente no corpo receptor; E_f = fluxo de efluente; e W_f = fluxo de curso de água). Assim, utilizamos as concentrações correspondentes a 2,5% (0,005%) e 25% (0,05%) da concentração ambiental estimada de efluente de curtume, visando avaliar os efeitos de EC em baixas concentrações. Os valores das análises físico-químicas do EC são apresentados na tabela 1. Já os componentes orgânicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Características físico-químicas do efluente de curtume do tipo *wet blue*, das concentrações utilizadas no experimento e da água potável. (Adaptado de MONTALVÃO et al., 2018).

Atributos	Efluente de curtume	Grupo I (0,005%) *	Grupo II (0,05%)*	Água potável	Valores para água potável (CONAMA)
pH a 25 °C (Potenciométrico)	4,05	7,04 ±0,07	7,04±0,11	7,19	6,00 – 9,50
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	37.380,00	1,90	19,06	80,00	SR**
Sódio (mg L ⁻¹)	9.690,00	0,49	4,94	5,01	SR**
Zinco (mg L ⁻¹)	0,30	<0,0001	0,0001	0,03	0,18
Cálcio (mg L ⁻¹)	601,20	0,030	0,306	4,00	SR**
Chumbo (mg L ⁻¹)	0,32	<0,0001	0,0001	<0,01	0,50
Arsênio (mg L ⁻¹)	<0,010	<0,0001	<0,0001	<0,01	0,010
Magnésio (mg L ⁻¹)	364,80	0,018	0,186	2,43	SR**
Cromo (mg L ⁻¹)	859,00	0,043	0,438	<0,05	0,05
Cádmio (mg L ⁻¹)	0,95	<0,0001	0,0004	<0,001	0,001
Níquel (mg L ⁻¹)	5,5	0,0002	0,002	<0,01	0,025

*Valores proporcionais para o grupo I e grupo II (com exceção de pH que foi medido na água dos aquários). **Sem registro.

Tabela 2. Componentes orgânicos identificados no efluente de curtume do tipo *wet blue* (efluente bruto). (Adaptado de MONTALVÃO et al., 2018).

ID*	Fórmula molecular	Nome
1	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	5-Cyclohexyl-5-oxopentanoic acid
2	C ₁₉ H ₁₈ NO ₂	1-Benzoyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-6-quinolinol
3	C ₁₉ H ₁₈ NO ₃	(S)-3-Hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester
4	C ₂₀ H ₁₈ NO ₃	2-(4-Butoxy-phenyl)-quinoline-4-carboxylic acid
5	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	(2S)-1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid
6	C ₂₀ H ₁₄ N ₃ O ₃	(5,6-Diphenyl-furo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamino)-acetic acid
7	C ₂₉ H ₄₃ O ₂	4,4'-Methylenebis[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenol]
8	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₃ S	1,2-Naphthalenediol, 5,6,7,8-tetrahydro-6-[[6-[[2-(2-methoxyphenyl)thio]ethyl]amino]hexyl]propylamino]
9	C ₂₆ H ₄₁ N ₄ O ₁₃	3-Amino-3-désoxy-β-D-glucopyranoside de (1S,2R,3S,4S,6R)-4,6-diamino-3-[(6-[(benzyloxy)carbonyl]amino}-6-désoxy-β-D-glucopyranosyl)oxy]-2-hydroxycyclohexyle
10	C ₄₄ H ₂₈ NO ₆	N-[3'-Hydroxy-6'-(1-naphthylmethoxy)-3-oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl]-4-biphenylcarboxamid
11	C ₄₃ H ₆₀ N ₃ O ₁₁	2-propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-, (3aR,4R,6S,7aR)-6-[[[4-[[[1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-[[[4-(octyloxy)phenyl]amino]carbonyl]butyl]amino]carbonyl]hexahydro-6-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl ester, (2E)
12	C ₁₂ H ₁₇ NONa	Diethyl toluamide
13	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₄	Ethyl 6-(2-furyl)-2-hydroxy-4-methyl-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate
14	C ₁₆ H ₃₆ NO ₂	N-Lauryldiethanolamine
15	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	Dibutyl phthalate (plasticizer contaminant)
16	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ Na	Ethyl 1-(4-morpholinylcarbonyl)-4-piperidinecarboxylate
17	C ₂₄ H ₃₉ O ₄	Diocetyl phthalate (plasticizer contaminant)
18	C ₂₉ H ₃₁ NONa	5-(4-tert-butylphenyl)-2,2-dimethyl-1,3,5,6-tetrahydrobenzo[a]phenanthridin-4-one

*Identificação.

2.3. Análises dos parâmetros biométricos

Foram realizados três grupos experimentais: grupo controle (0% de efluente de curtume); grupo I, exposto a 0,005% do EC (que corresponde a 2,5% da concentração ambiental estimada de EC); e grupo II, exposto a 0,05% (correspondente a 25% da concentração ambiental estimada de EC). Cada grupo foi composto por 13 peixes. Os animais foram expostos ao efluente de curtume por um período de 96 horas em aquários individuais (40x30x50 cm, com 43 litros de água desclorada). Usou-se cascalho como substrato nos aquários. Não houve a troca de água durante o experimento, o que configura o sistema como estático.

Os animais foram medidos com um paquímetro (comprimento total) e pesados com uma balança de precisão antes e após o experimento, para análise de crescimento e ganho/perda de peso. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração em 3% do peso corpóreo, sendo que metade era oferecida de manhã e a outra a tarde. Ao final do período experimental os peixes foram anestesiados com eugenol ($1,6 \mu\text{L L}^{-1}$) e, posteriormente, realizou-se a eutanásia destes animais para a dissecação do fígado e cálculo do Índice Hepatosomático (IHS) ($\text{IHS} = (\text{Peso do fígado} / \text{Peso corporal}) \times 100$), uma vez que o IHS é considerado um biomarcador de poluição (AL-GHASIS, 2013).

2.4. Análises dos parâmetros comportamentais

Os peixes foram colocados nos aquários um dia antes do início do experimento para aclimação. Os peixes foram filmados no dia 1 (antes da adição do efluente de curtume), no dia 3 e dia 5, conforme o esquema apresentado na figura 1. Os animais foram filmados para análise do comportamento, da seguinte maneira: no período da manhã, os animais foram filmados por 7 minutos para obtenção dos dados sobre latência para alimentação e, após 30 minutos, foram filmados novamente por 2 minutos para analisar a locomoção. No período da tarde os peixes foram filmados por 8 minutos para análise do comportamento agonístico.

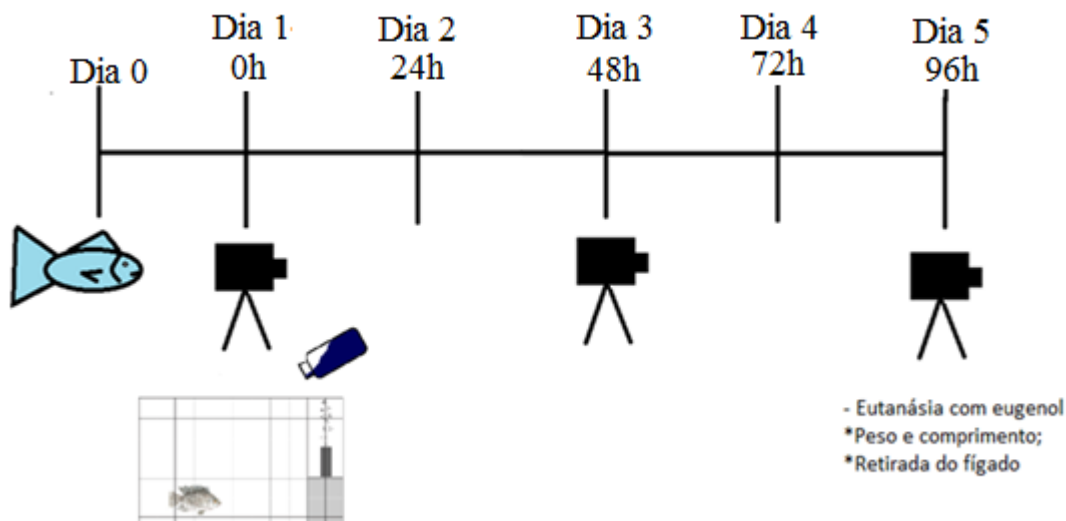


Figura 1. Esquema da duração do experimento e filmagens para análises comportamentais da exposição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao efluente de curtume.

Para a realização do teste de locomoção, foram dearcados quadrantes de 5x5 cm na parte frontal dos aquários para estimar a distância percorrida por cada peixe e o tempo de locomoção

durante dois minutos. Já no teste de comportamento agonístico usou-se um espelho (30x40 cm) na lateral esquerda do aquário para simular a presença de outro peixe e avaliar a agressividade, uma vez que os peixes não reconhecem sua própria imagem (FRANCIS, 1990; ROWLAND, 1999). O espelho era retirado no final de cada filmagem. Os comportamentos agonísticos analisados foram a latência para primeiro ataque, número de ondulações, frequência de ataques frontais e de ataques totais (ALVARENGA & VOLPATO, 1995).

2.5 Análises estatísticas

Inicialmente foram retirados os valores *outliers* através do box-plot e em seguida foram realizados os testes de normalidade (Teste de Shapiro-Wilker) e homogeneidade de variância (Teste de Bartlett) dos dados. Os dados com apenas um fator e que apresentaram normalidade e homogeneidade foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way*. Nos casos em que os dados não apresentaram esses pressupostos, usou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Já para os dados comportamentais, usou-se a ANOVA *two-way* para os dados com normalidade e homogeneidade, e o teste semi-paramétrico da ANOVA ranqueada para a análise dos dados não-paramétricos.

O teste de média utilizado foi o LSD, pois o coeficiente de variação de todos os resultados ficou acima de 20%. Adotou-se $p < 0,05$ como nível de significância. Todos os cálculos foram feitos no software livre R (R CORE TEAM, 2017). Nos testes da ANOVA *two way* as concentrações de efluente foram consideradas o fator 1 (com três níveis: controle (0%); grupo I (0,005%) e grupo II (0,05%)) e o tempo de exposição como fator 2 (com três níveis: 0 horas de exposição- dia 1; 48 horas de exposição- dia 3 e 96 horas de exposição- dia 5).

2.6 Questões éticas

O projeto, que deu origem a esse estudo, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano (protocolo nº 3088020216).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados referentes ao ganho de peso dos peixes durante a realização do experimento demonstrou que não houve diferença significativa no ganho/perda de peso entre os indivíduos expostos ao EC e os não expostos ($H(2) = 2,7996$; $p = 0,24$) (Figura 2-A). Também não houve diferença significativa no crescimento entre os peixes expostos ao efluente e os peixes do grupo controle ($H(2) = 1,351$; $p = 0,50$) (Figura 2-B). Gbem et al. (2003) observaram

que juvenis de *Clarias garipinus* expostos ao efluente de curtume apresentaram menor ganho de peso em relação a peixes do grupo controle. Porém, o tempo de exposição foi maior (8 semanas) do que o tempo usado nesta pesquisa, o que pode explicar a diferença de resultado entre os estudos. Parâmetros biométricos podem variar quando ocorrem mudanças bioquímicas e/ou metabólicas nos organismos expostos, desde que a exposição ao poluente tóxico seja suficiente para causar algum tipo de dano (ALMEIDA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2009; GBEM et al., 2003).

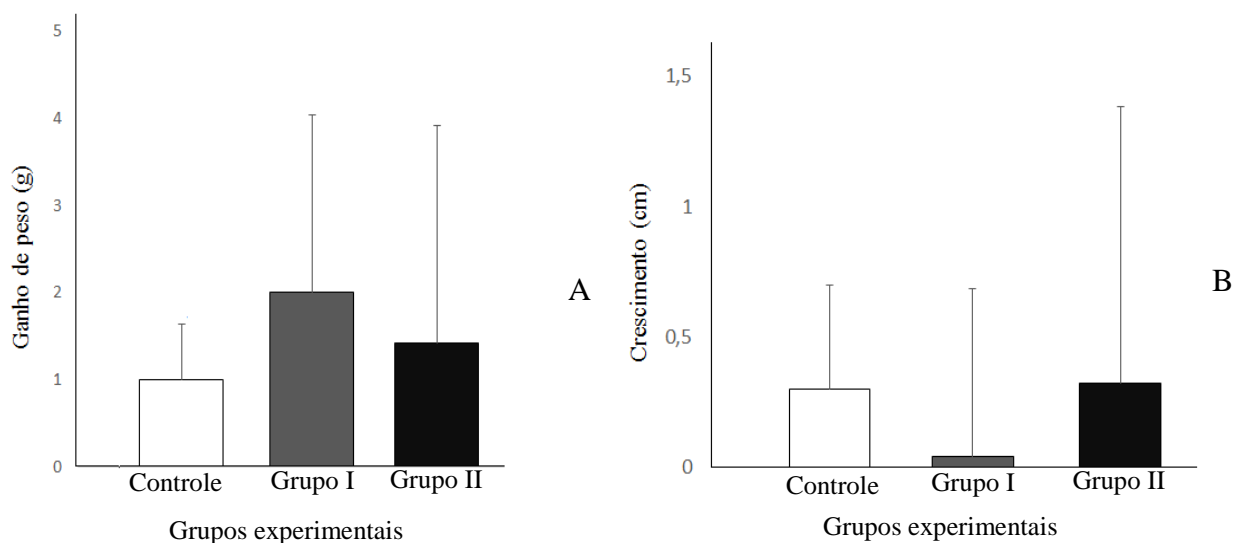


Figura 2. Efeitos do efluente de curtume sobre o ganho de peso (A) e crescimento (comprimento total) (B) da tilápia-do-Nilo exposta ao contaminante por 96 horas (Média ± DP).

Já em relação ao IHS, foi observado que o grupo II (25%) apresentou maior IHS quando comparado ao grupo controle e o grupo I (2,5%) ($F(2,36) = 3,5923$; $p = 0,03$), como demonstrado na figura 3. Estudos têm demonstrado que, de modo geral, peixes expostos a diferentes tipos de poluentes apresentam aumento do IHS (ADAMS & RYON, 1994; SLOOFF et al., 1983). O fígado é um dos órgãos mais vulneráveis aos efeitos de substâncias tóxicas e está mais propenso ao acúmulo de metais pesados (CEOLIN, 2010; QADIR & MALIK, 2011), e o seu aumento pode estar relacionado à hiperplasia e/ou hipertrofia, a estímulos hepático-enzimática e/ou acumulação de lipídeos e glicogênio devido a redução do metabolismo lipídico (ADAMS et al., 1992; ADAMS & RYON, 1994; SLOOFF et al., 1983). Uma vez que o fígado exerce diversas funções vitais, inclusive o metabolismo de tóxicos e processos de detoxificação, os danos causados por xenobióticos a esse órgão podem prejudicar a qualidade de vida e interferir na sobrevivência dos organismos expostos a poluentes (PEREIRA, 2015).

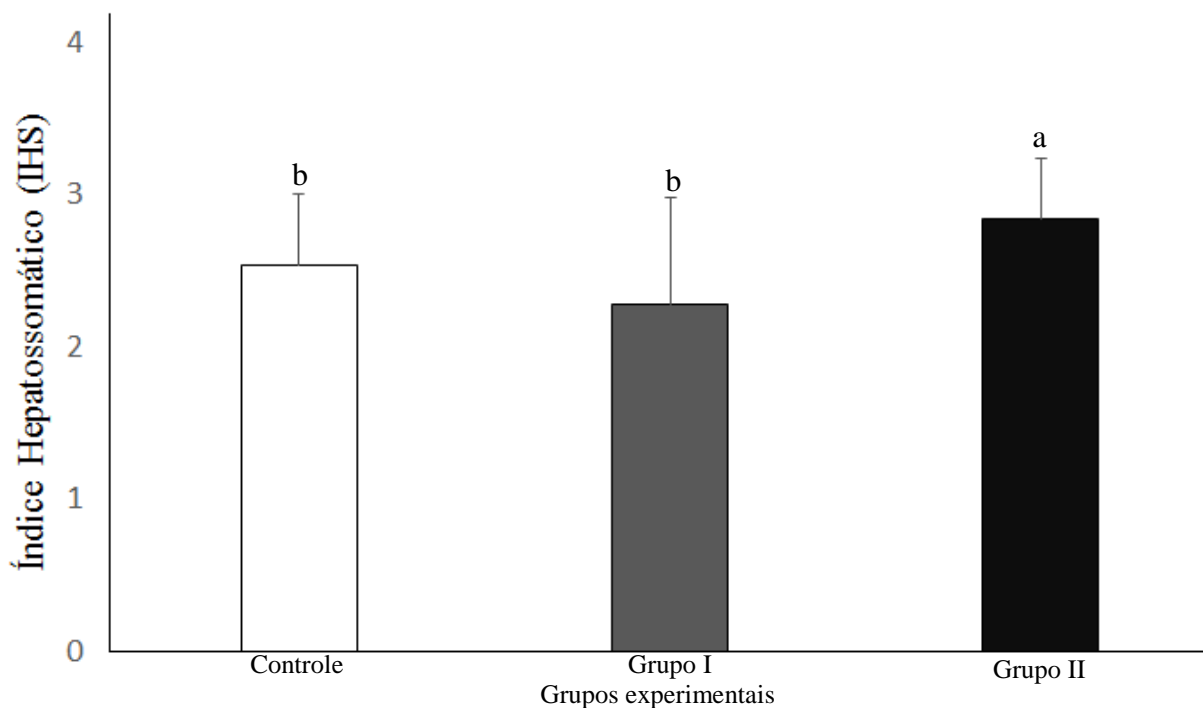


Figura 3. Índice Hepatossomático de *Oreochromis niloticus* exposta ao efluente de curtume por 96 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, de acordo com o teste de média LSD (Média \pm DP).

Não houve alterações no comportamento alimentar dos peixes expostos ao EC, uma vez que a latência para alimentação não variou entre os grupos e entre os dias analisados (Fator 1-(F (2, 108) = 0,4498, p=0,63); Fator 2-(F (2, 108) =2,6669, p=0,07); Interação entre os fatores-(F (4,108) =0,9769, p=0,48)) (Figura 4). Gbem et al. (2003) verificaram que peixes da espécie *Clarias guriepinus* expostos a 2% e 6% de EC por longos períodos (8 semanas) apresentaram redução das atividades físicas, especialmente da alimentação.

As concentrações de EC testadas não alteraram o comportamento de locomoção dos peixes, quando expostos por cinco dias, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos em relação à distância percorrida (Fator 1-(F (2, 108) =0,3513, p=0,70); Fator 2-(F (2, 108) =0,9859, p=0,37); Interação entre os fatores-(F (4,108) =1,3651; p= 0,25)) (Figura 5-A) e ao tempo de movimentação (Fator 1-(F (2, 108)=0,3332, p=0,71); Fator 2-(F (2, 108) =2,1333, p=0,12); Interação entre os fatores -(F (4,108) =0,6973, p=0,59)) (Figura 5-B). Ganeshwade et al. (2006) relataram que *Cyprinus carpio* apresentaram alterações nos padrões de movimentação (natação agitada e aleatória, natação com abdome para cima, indicando perda

de equilíbrio) quando expostos ao efluente de curtume. Peixes da espécie *Pomatochistus microps*, quando expostos à metais, como o cobre (0 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) (metal presente no efluente de curtume) e o mercúrio (0 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 96 horas, também apresentaram alterações na capacidade de locomoção, pois tinham menor resistência à natação contra o fluxo de água e se locomoveram por distâncias menores (VIEIRA et al., 2009). Embora a capacidade de locomoção seja considerada um comportamento simples, é importante estudar os efeitos de tóxicos sobre a movimentação, pois a redução na capacidade de natação em peixes pode comprometer na captura de alimentos, fuga de predadores, entre outros comportamentos essenciais para a sobrevivência do organismo (TIERNEY, 2011; VIEIRA et al., 2009).

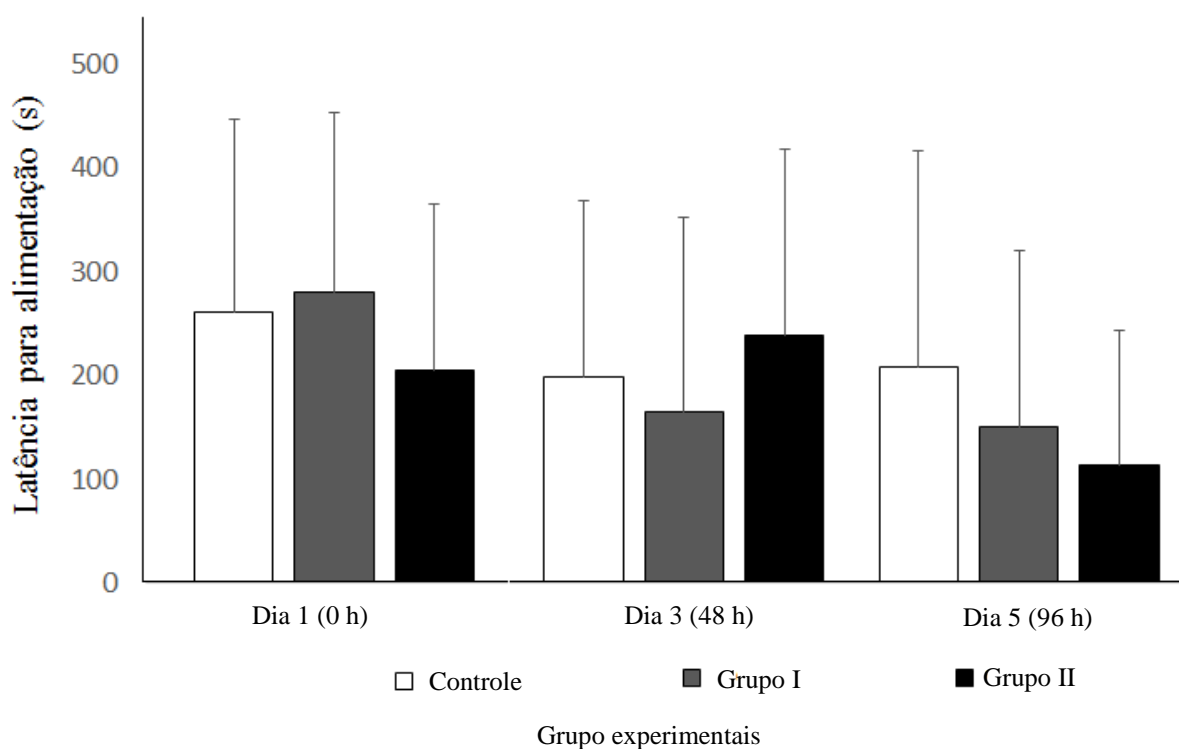


Figura 4. Latência para alimentação de *Oreochromis niloticus* exposta a diferentes concentrações de efluente de curtume por 96 horas (Média \pm DP).

Em relação ao comportamento agonístico, todas as variáveis analisadas apresentaram alterações nos grupos expostos ao EC em relação ao grupo controle, indicando que o EC do tipo *wet blue* aumenta a agressividade em tilápia-do-Nilo. Os resultados indicaram que houve influência das concentrações (fator 1-(F (2, 108) =3,975, p=0,02)) e interação entre os fatores “tempo de exposição” com o fator “concentrações do efluente de curtume” (F (4, 108) =3,720, p<0,01) na latência para o primeiro ataque. Enquanto no grupo controle, os peixes apresentaram um aumento na latência de ataque ao longo do período de exposição, nos grupos expostos ao

efluente a latência de ataque reduziu com o tempo de exposição. Já a diferença entre os grupos foi significativa apenas no último dia do experimento (96 horas de exposição), com ambos os grupos expostos apresentando menor latência quando comparado com o controle (Figura 6-A).

O EC também alterou o comportamento de ataques frontais, uma vez que os peixes expostos apresentaram maior frequência deste tipo de comportamento agonístico quando comparados com os peixes do grupo controle (Fator 1-(F (2, 108) =0,5310, p=0,58); Fator 2-(F (2, 108) =3,5967, p=0,03); Interação entre os fatores-(F (4,108) =3,5967, p<0,01) (Figura 6-B). A frequência de ondulações também variou entre os grupos, pois no grupo controle foi observada uma redução na quantidade de ondulações ao longo do tempo, enquanto no grupo I (0,005%) não houve variação significativa na quantidade de ondulações durante o período de exposição. Já no grupo II (0,05%) foi verificado o aumento de ondulações com o aumento de tempo de exposição. Porém, a comparação entre os grupos apresentou resultado significativo apenas no último dia do experimento, em que o grupo II (0,05%) apresentou maior frequência de ondulação do que os demais grupos (Fator 1-(F (2, 108) =2,349, p=0,07); Fator 2-(F (2, 108) =9,5876, p<0,01); Interação entre os fatores- (F (4,108) =2,1133; p= 0,08)) (Figura 7-A). A análise dos dados sobre a frequência de ataques totais demonstrou que os peixes dos grupos expostos ao EC atacaram mais sua imagem refletida do que os peixes do grupo controle (Fator 1-(F (2, 108) =0,5429, p=0,58); Fator 2-(F (2, 108) =4,1376, p=0,01); Interação entre os fatores-(F (4,108) = 2,7276, p=0,03)) (Figura 7-B).

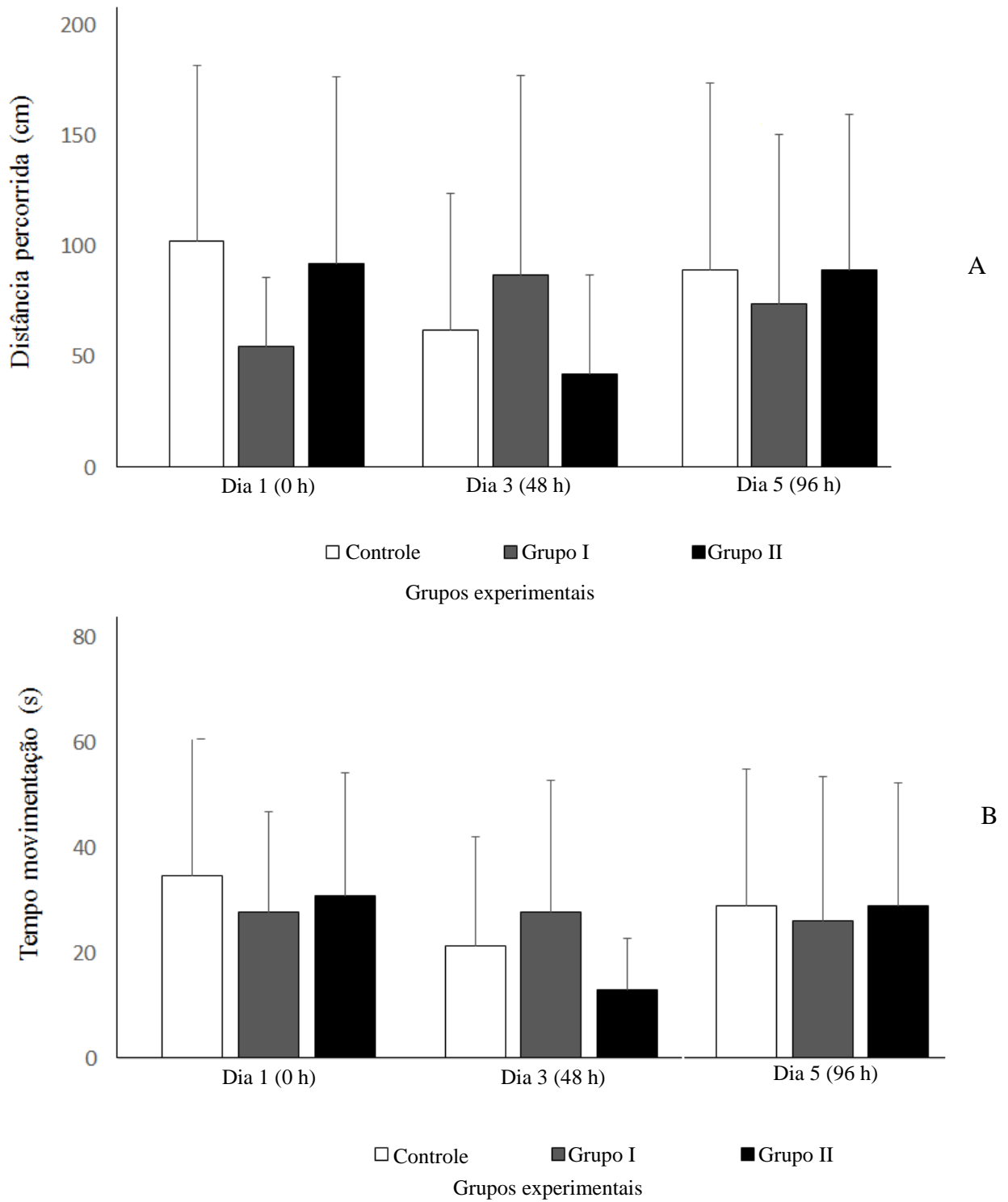


Figura 5. Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* ao efluente de curtume por 96 horas sobre a distância percorrida (A) e o tempo em movimentação (B) (Média ± DP).

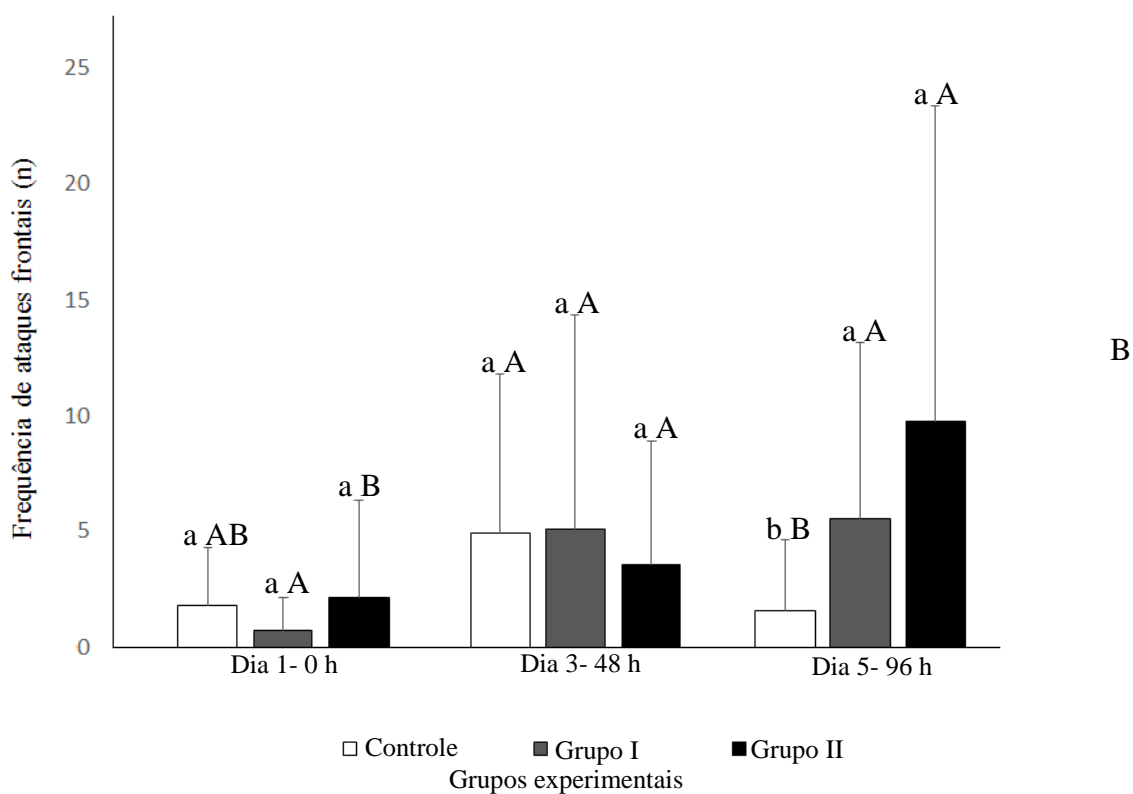
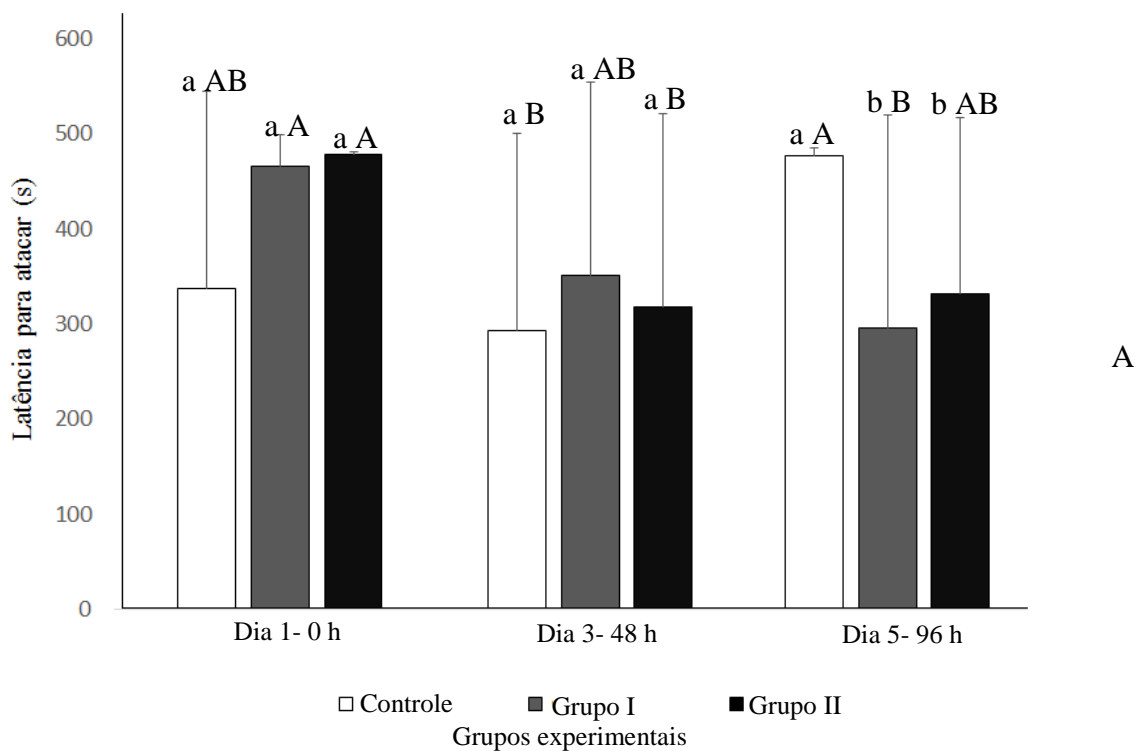


Figura 6. Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* a diferentes concentrações de efluente por 96 horas sobre a latência para atacar espelho (A) e sobre a frequência de ataques ao espelho. Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias, de acordo com o teste LSD (Média ± DP).

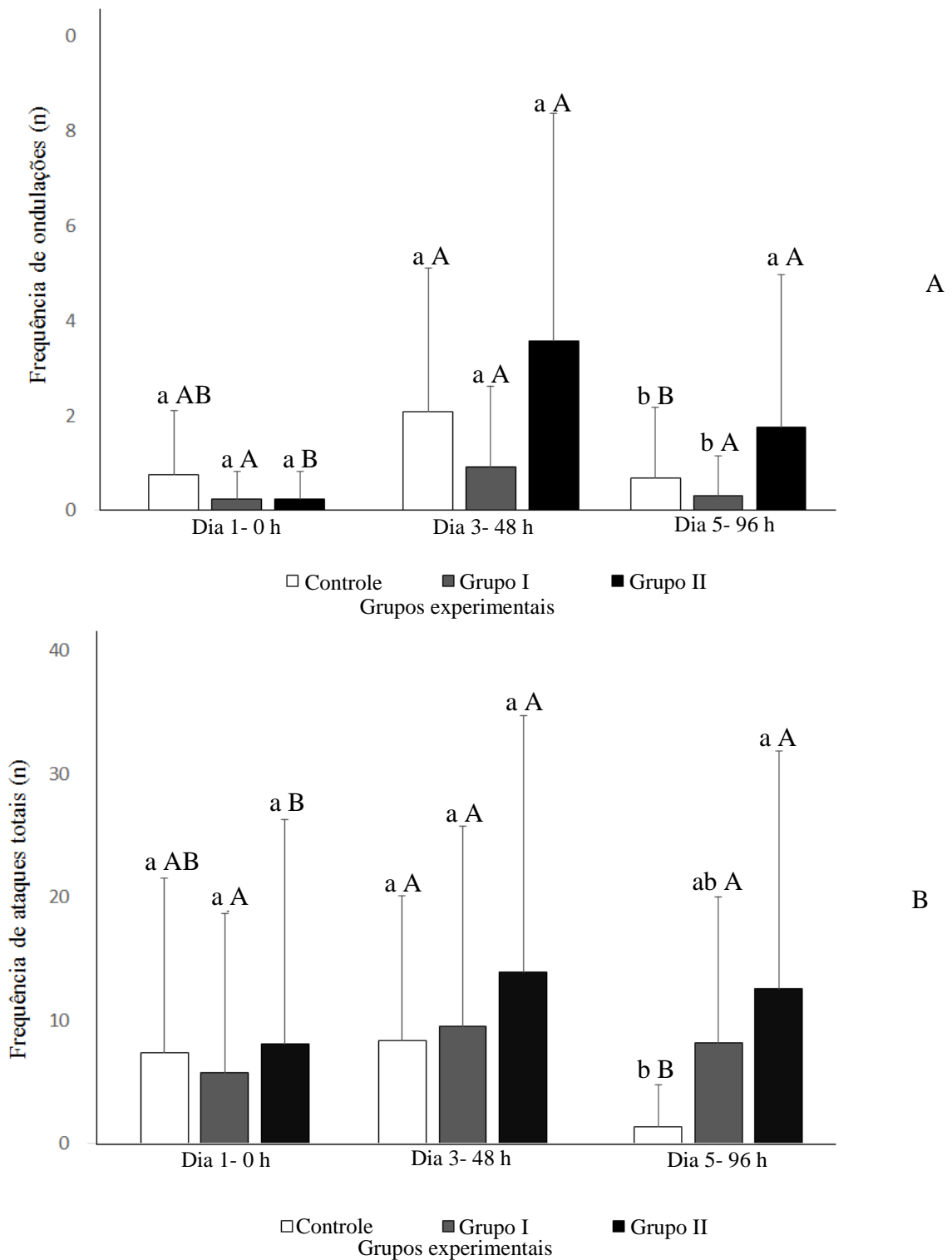


Figura 7. Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* a diferentes concentrações de efluente sobre a frequência de ondulações (A) e sobre a frequência de ataques totais (B). Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias, de acordo com o teste de média LSD (Média ± DP).

O EC é uma mistura complexa, contendo metais pesados como o cádmio, níquel, chumbo, entre outros, sendo que esses metais podem alterar o comportamento agonístico de peixes (HENRY & ATCHISON, 1986; SLOMAN et al., 2003; ALMEIDA et al., 2009). Almeida et al. (2009) verificaram que a concentração de 0,75 mg L⁻¹ de cádmio causou o aumento da latência para atacar e reduziu a frequência de lutas totais em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, quando expostos por 15 dias (ALMEIDA et al., 2009). O cádmio também reduziu a frequência de ataques em *Oncorhynchus mykiss* expostas por 24 horas à uma concentração de 3,3 µg L⁻¹ de cádmio, além de reduzir a capacidade dos peixes expostos de se tornarem dominantes durante o processo da formação de hierarquias (SLOMAN et al., 2003). Porém, outros metais testados por Sloman et al. (2003) como o chumbo (150 µg L⁻¹), cobre (15µg L⁻¹), níquel (2250 µg L⁻¹) e zinco (130 µg L⁻¹) não causaram alterações no comportamento agonístico de *Oncorhynchus mykiss* quando expostos por 24 horas. Já o cobre, na espécie *Lepomis macrochirus*, aumentou a frequência de ameaças e mordidas quando expostos as concentrações de 0,034, 0,057 e 1,30 mg L⁻¹ de cobre por 96 horas. Tais estudos mostram a complexidade na resposta biológica de diferentes espécies de peixes testados, e as diferenças encontradas podem ser efeito da sua mistura no EC.

Sabe-se que alguns metais pesados presentes no efluente de curtume do tipo *wet blue*, como o cobre e o chumbo, podem agir como neurotoxinas e que outros metais, como o cádmio e o cromo causam estresse oxidativo, liberando radicais livres que podem reagir com a membrana celular e causar peroxidação lipídica, o que pode estar relacionado com alterações neurológicas e comportamentais, como a agressividade (SCOTT & SLOMAN, 2004; WALIA et al., 2015; ÖZKAN et al., 2011; PEREIRA, 2015; ESTRELA et al., 2017). Ademais, Navaraj & Yasmin (2012) relataram a ocorrência de necrose no tecido cerebral de *Oreochromis mosambicus* exposto a diferentes concentrações de efluente de curtume por 60 dias, o que pode contribuir para alterações comportamentais. Assim, alterações na agressividade de peixes pode comprometer relações de dominância, territorialidade e reprodução, podendo ter efeitos negativos sobre as populações de peixes, uma vez que as formações hierárquicas ajudam na estabilidade destas populações (SCOTT & SLOMAN, 2004; SLOMAN et al., 2003). Contudo, são necessários novos estudos que avaliem os possíveis mecanismos de ação do efluente que podem causar alterações em comportamento dos organismos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a exposição ao efluente do tipo *wet blue* por um período de 96 horas, mesmo em concentrações abaixo dos valores estimados na natureza, pode causar alterações no

IHS e aumentar a agressividade da tilápia-do-Nilo. Desta maneira, os resultados demonstraram que esse contaminante pode causar danos aos peixes, os quais podem ter impacto ecológicos na sua sobrevivência e reprodução.

5. REFERÊNCIAS

Adams SM, Crumby WD, Greeley MS, Ryon MG, Schilling EM. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1549-1557, 1992.

Adams SM, Ryon MG. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress in fish populations. *Journal o Aquatic Ecosystem Health.* 3, 15-25, 1994.

Alvarenga CMD, Volpato GL. Agonist profile and metabolism in alevins of the Nile Tilapia. *Physiology & Behavior.* 57 (1)

Al-Ghais SM. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin.* 74, 183-18, 2013.

Almeida JA, Novelli ELB, Dal Pai Silva M, Alves Júnior R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution.* 114, 169-175, 2001.

Almeida J A, Barreto RE, Novelli ELB, Castro FJ, Moron SE. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotropical Ichthyology.* 7 (1), 103-108, 2009.

Bolis CL et al. Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research.* 44 (4), 265-280, 2001.

Câmara RP de B, Gonçalves-Filho EV. Análise dos custos ambientais da indústria de couro sob a ótica da eco-eficiência. *Custos e @gronegocio on-line.* 3 (1), 87-110, 2007. Disponível em: <<http://www.custoseagronegocioonline.com.br/numero1v3/custos%20ambientais.pdf>> Acesso em: 20 dez. 2015.

Ceolin D. Efeitos da exposição crônica do manganês sobre camundongos machos adultos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

Correa AR, Rosa SES. Informe Setorial: A indústria de curtumes no Brasil. Área industrial, n. 3. Brasília: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, out. 2007.

CICB- Centro das Indústrias de Curtume do Brasil. Exportação brasileira de couros e peles- 2017. Disponível em: <www.cicb.org.br/storage/files/repositories/phpeXCSfk-total-exp-dez17-vr.pdf>. Acesso em: 10 de jan. 2018.

Escobar N. Exportação de couro cresce. Revista Pecuária Brasil, 2014. Disponível em: <<http://www.revistapecuariabrasil.com.br/acontece/60-exportao-de-couro-cresce>>. Acesso em: 05 maio 2017.

Estrela FN, Rabelo LM, Vaz BG, Costa DR de O, Pereira I, Rodrigues AS de L, Malafaia G. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluente and possible mechanism of action. Chemosphere. 184, 148-158, 2017.

Francis RC. Teperament in a fish: a longitudinal study of the development of individual differences in aggression and rank in the Midas cichlid. Ethology. 86, 311-325. 1990.

Ganem, R.S. Curtumes: aspectos ambientais. 2007. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1281/curtumes_aspectos_senna.pdf?squence=1>. Acesso em: 20 maio 2017.

Ganeshwade RM, Rokade PB, Sonwane SR. Behavioral responses of *Cyprinus carpio* to industrial effluents. Journal of Environmental Biology. 27 (1), 159-160, 2006.

Gbem TT et al. Trace metal accumulation in *Clarias gariepinus* (Teugels) exposed to sublethal levels of tannery effluent. The Science of the Total Environment. 271 (1), 1-9, 2001.

Gbem TT, Balogun JK, Lawal FA, Annune PA, Auta J. Sublethal effects of tannery effluent on some hematological indices and growth of *Clarias gariepinus* (Teugels). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 71, 1200-1206, 2003.

Godecke MV, Rodrigues MAS, Naime RH. Resíduos de curtume: estudo das tendências de pesquisa. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. 7 (7), 1357-1378, 2012.

- Henry MG, Atchison GJ. Behavioral changes in social groups of bluegills exposed to copper. *Transactions of the American Fisheries Society*. 115, 590-595, 1986.
- Jordão CP, Silva AC, Pereira JL, Brune W. Contaminação por Crômio de águas de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*. 22 (2), 47-52, 1999.
- Lima JEW, Silva EM. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: Scariot, A.; Sousa-Silva, J. C.; Felfili, J. M. (org.). *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- Magalhães D de P, Ferrão-Filho A da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*. 12 (3), 355-381, 2008.
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malaguittii MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetic and Molecular Biology*. 29 (1), 148-158, 2006.
- Montalvão MF, Castro AL da S, Rodrigues AS de L, Mendes B de O, Malafaia G. Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. *Science of the Total Environment*. 610-611, 1595-1606, 2018.
- Moysés FS et al. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & Behavior*, v.129, p.160-166, 2014
- Murugesan AG, Ramathilaga a, Samson Polselvan JK, Dinakaran Michael R. Immunotoxicity of tannery effluente to the freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 88, 639-643, 2012.
- Naravaj PS, Yasmin J. Toxicological evaluation of tannery industry waste water on *Oreochromis mossambicus*. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 6 (9), 331-336, 2012.
- Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Özlüer Hunt A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cádmium doses. *Turk J Zool*. 35 (4), 585-592, 2011.

Pereira MVM. Avaliação da qualidade da água em cinco reservatórios do Rio Iguaçu através de biomarcadores em *Astyanax bifasciatus* (Characiformes, Characidae). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

Prado MV, Bezado AP, Grandó FR (coord.). Estudo do setor de curtumes. Instituto de Estudos e Marketing Industrial (IEMI)/ Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil (CICB), out. 2013. Disponível em: <<http://www.cicb.org.br/wp-content/uploads/2014/11/estudo-IEMI.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

Qadir A, Malik RN. Heavy metals in eight edible fish species from two polluted tributaries (Aik and Palkhu) fo the river Chenab, Pakistan. Biol Trace Elem Res. 143, 1524-1540, 2011.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. Disponível em <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 de out. de 2017.

Rodrigues MLK, Formoso MLL. Exposure to selected heavy metals through water ingestion in na area under the influence of tanneries. Environmental Geochemistry and Health. 27, 397-408, 2005.

Rowland WJ. Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. Environmental Biology of fishes. 56, 285-305, 1999.

Scott GR, Sloman KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquatic Toxicology. 68, 369-392, 2004.

Silva GV da. Caracterização de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo. 2010. 35 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99398>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

Silva HSVP da, Loiola C, Pereira SRF, Santos RL, Andrade GV, Nunes GS. Toxicologia aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600 BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). Pesticidas: revista Ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba. 23, 1-10, 2013.

Silva SVS, Dias AHC, Dutra ES, Pavani AL, Morelli S, Pereira BB. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: 10.1080/15287394.2015.1099484, .01-09, 2015.

Sloman KA, Baker DW, Ho CG, McDonald DG, Wood CM. The effects of trace metal exposure on agonistic encounters in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 63, 187–196, 2003.

Slooff W, Van Kreijl CF, Baars AJ. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface Waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*. 4, 1-14, 1983.

Tierney KB. Behavioral assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812, 381-389, 2011.

Vieira LR, Gravato C, Soares AMUM, Morgado F, Guilhermino L. Acute effects of copper and Mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*. 76, 1416-1427, 2009.

Walia GK, Handa D, Kaur H, Kalotra R. Ecotoxicological studies on fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent by using micronucleus test. *Nucleos*. 58 (2), 111-116, 2015.

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

A poluição dos recursos hídricos é atualmente um grande problema ambiental e social. Uma das principais fontes poluidoras dos ecossistemas aquáticos são os efluentes industriais, com destaque para os efluentes provenientes das indústrias de couro, que geram grandes quantidades de resíduos tóxicos, os quais podem causar impactos nos organismos aquáticos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao efluente de curtume (EC) nos parâmetros biométricos, comportamentais e mutagênicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para isso, foram formados três grupos experimentais com 13 peixes cada: grupo controle (0% de efluente de curtume), grupo de exposição I (50% (0,1%) da concentração ambiental estimada) e grupo de exposição II (100% (0,2%) da concentração ambiental estimada). Para o teste de mutagenicidade foi utilizado um grupo controle positivo, em que os peixes foram expostos a 100 mg L⁻¹ de ciclofosfamida. Os peixes foram expostos ao EC por 96 horas. O tamanho e o peso dos peixes foram aferidos no início e final do experimento para as análises biométricas. Não foram observados efeitos da exposição ao efluente de curtume nos parâmetros biométricos da tilápia-do-Nilo. Também não houve alterações no comportamento alimentar e de movimentação. Porém, os peixes expostos ao efluente de curtume apresentaram alteração na resposta à presença do objeto estranho. O EC também induziu aumento da frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares em eritrócitos dos peixes expostos. Conclui-se, assim, que o EC apresenta toxicidade à tilápia-do-Nilo, causando alterações comportamentais e danos mutagênicos.

Palavras-chave: Ecossistemas aquáticos; Poluentes; Peixes; Metais pesados. Biomarcadores

EFFECTS OF EXPOSURE TO THE EFFLUENT OF TANNERY IN THE BIOMETRIC, BEHAVIORAL AND MUTAGENIC PARAMETERS OF NILE-TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

Pollution of water resources is currently a major environmental and social problem. One of the main sources of pollution of aquatic ecosystems is industrial effluents, especially effluents from leather industries, which generate large amounts of toxic waste, which can cause impacts on aquatic organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of exposure to tannery effluent (EC) on the biometric, behavioral and mutagenic parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). For this, three experimental groups were formed with 13 fish each: control group (0% tannery effluent), exposure group I (50% (0.1%) of the estimated environmental concentration) and exposure group II (100% (0.2%) of the estimated environmental concentration). For the mutagenicity test a positive control group was used, in which the fish were exposed to 100 mg L⁻¹ of cyclophosphamide. The fish were exposed to EC for 96 hours. The size and weight of the fish were measured at the beginning and end of the experiment for the biometric analyzes. No effects of tanning effluent exposure on the biometric parameters of Nile tilapia were observed. There were also no changes in eating and handling behavior. However, the fish exposed to the tannery effluent presented alteration in the response to the presence of the foreign object. EC also induced increased micronucleus frequency and nuclear abnormalities in erythrocytes of exposed fish. It is concluded, therefore, that EC is toxic to Nile tilapia, causing behavioral changes and mutagenic damage.

Keywords: Water Ecosystems; Pollutants; Fish; Heavy metals, Biomarkers

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos ecossistemas aquáticos é um problema sério, uma vez que a vida depende principalmente deste recurso para existir. Rios, lagos, mares, entre outras fontes de água são constantemente degradados, principalmente pela poluição de resíduos líquidos e sólidos (WALIA et al., 2015). As ações antrópicas são responsáveis por essa degradação, sendo que uma das principais fontes de poluição são os efluentes industriais (MORAES & JORDÃO, 2002; CARVALHO et al., 2004). Um dos efluentes mais danosos para o ambiente gerado atualmente provem das indústrias de curtumes, pois o processamento da pele bovina em couro necessita de vários componentes tóxicos orgânicos e inorgânicos, como os metais pesados, dentre eles o cromo, cádmio e chumbo (GODECK et al., 2012). Devido a sua complexa composição de elementos tóxicos, a poluição causada pelo descarte ou tratamento ineficiente de EC e pode prejudicar os ecossistemas aquáticos, reduzindo a disponibilidade dos recursos hídricos, além de poder causar danos aos animais, principalmente àqueles que habitam nos meios aquáticos, como os peixes (GANEM, 2007; BRITO, 2013).

Devido à capacidade de causar danos ambientais e de saúde, vários autores têm pesquisado sobre quais são os efeitos da exposição ao efluente de curtume em diferentes organismos como mamíferos (GUIMARÃES et al., 2016), aves (SOUSA et al., 2017), anfíbios (MONTALVÃO et al., 2018), invertebrados (MOYSÉS et al., 2017) e peixes (WALIA et al., 2015). Dentre os organismos utilizados em pesquisas voltadas para impactos ambientais, os peixes se destacam uma vez que estão sujeitos à exposição direta dos contaminantes aquáticos (GBEN et al., 2001; SCOTT & SLOMAN, 2004).

Alguns dos efeitos conhecidos causados pela exposição ao efluente de curtume em diferentes espécies de peixes são imunotóxicos (MURUGESAN et al., 2012), mutagênicos e genotóxicos (WALIA et al., 2013; WALIA et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2006), efeitos hematológicos e biométricos (GBEN et al., 2003) e com alterações ao comportamento natatório (GANESHWADE et al., 2005). Entretanto, há poucos estudos sobre os impactos que o EC pode causar em aspectos comportamentais dos peixes.

Estudos comportamentais são importantes, pois o comportamento representa a interação de processos fisiológicos com os estímulos ambientais e ecológicos (SCOTT & SLOMAN, 2004). Além disso, no contexto ecológico, os estudos ecotoxicológicos que avaliam parâmetros comportamentais são importantes, pois a exposição a concentrações subletais, ou seja, concentrações menores do que aquelas que causam a morte, podem reduzir o desempenho de

diferentes comportamentos essenciais para a sobrevivência e reprodução dos indivíduos na natureza (SCOTT & SLOMAN, 2004).

Outro tipo de efeito dos poluentes nos organismos é denominado de mutagênico, o qual pode causar danos no material genético e culminar no surgimento de cânceres e até a morte celular (BONASSI et al., 2007). Embora já se conheçam alguns efeitos mutagênicos do efluente de curtume (WALIA et al., 2013; WALIA et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2006), é importante avaliar os efeitos da exposição de determinados tóxicos em diferentes organismos, pois espécies diferentes podem apresentar maior ou menor sensibilidade a determinados tóxicos, além de ocuparem níveis tróficos e habitats distintos (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015; QADIR & MALIK, 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao EC do tipo *wet blue* nos parâmetros biométricos, comportamentais e mutagênicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Indivíduos adultos e do sexo masculino de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram utilizados como modelo biológico, com tamanho médio de $11,74 \pm 0,54$ cm e peso médio de $32,08 \pm 3,68$ g. Os animais foram adquiridos no setor de piscicultura do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí e aclimatados por um período de 15 dias antes da realização dos experimentos, com exposição ao fotoperíodo natural. Neste período, os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial para peixes (28% de proteína bruta).

2.2. Efluente de curtume, concentrações ambientais e concentrações utilizadas

O efluente utilizado foi proveniente de uma indústria curtumeira localizada no município de Inhumas-GO. Montalvão et al. (2018), utilizando dados de volume de pele processada em uma indústria curtumeira e o volume do corpo d'água onde o efluente é descartado (ilegalmente), estimaram a concentração ambiental de efluente de curtume em 0,2% (equação utilizada por Montalvão et al. 2017: $ECRB = [E_f / (E_f + W_f)]$, em que ECRB = Concentração de efluente no corpo receptor; E_f = fluxo de efluente; e W_f = fluxo de curso de água]). Assim, utilizamos as concentrações correspondentes a 50% (0,1%) e 100% (0,2%) da concentração ambiental estimada de efluente de curtume para os grupos experimentais. As características físico-químicas do EC e das concentrações utilizadas são apresentados na tabela 1. Já os componentes orgânicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Características físico-químicas e químicas do efluente de curtume do tipo *wet blue* e das concentrações utilizadas no experimento (adaptado de MONTALVÃO et al., 2018).

Atributos	Efluente de curtume	Grupo I (50%) *	Grupo II (100%)*	Água potável	Valores para água potável (CONAMA)
pH a 25 °C (Potenciométrico)	4,05	7,02±0,08	6,97±0,06	7,19	6,00 – 9,50
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	37.380,00	37,38	74,76	80,00	SR**
Sódio (mg L ⁻¹)	9.690,00	9,69	19,38	5,01	SR**
Zinco (mg L ⁻¹)	0,30	<0,001	<0,001	0,03	0,18
Cálcio (mg L ⁻¹)	601,20	0,6	1,2	4,00	SR**
Chumbo (mg L ⁻¹)	0,32	<0,001	<0,001	<0,01	0,50
Arsênio (mg L ⁻¹)	<0,010	<0,001	<0,001	<0,01	0,010
Magnésio (mg L ⁻¹)	364,80	0,36	00,72	2,43	SR**
Cromo (mg L ⁻¹)	859,00	0,85	1,7	<0,05	0,05
Cádmio (mg L ⁻¹)	0,95	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
Níquel (mg L ⁻¹)	5,5	<0,001	<0,001	<0,01	0,025

*Valores proporcionais para o Grupo I e Grupo II (com exceção do pH). ** Sem registro.

Tabela 2. Componentes orgânicos identificados no efluente de curtume do tipo *wet blue* (efluente bruto) (adaptado de MONTALVÃO et al., 2018).

ID	Fórmula molecular	Nome
1	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	5-Cyclohexyl-5-oxopentanoic acid
2	C ₁₉ H ₁₈ NO ₂	1-Benzoyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-6-quinolinol
3	C ₁₉ H ₁₈ NO ₃	(S)-3-Hydroxy-pyrrolidine-1-carboxylic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester
4	C ₂₀ H ₁₈ NO ₃	2-(4-Butoxy-phenyl)-quinoline-4-carboxylic acid
5	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	(2S)-1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid
6	C ₂₀ H ₁₄ N ₃ O ₃	(5,6-Diphenyl-furo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamino)-acetic acid
7	C ₂₉ H ₄₃ O ₂	4,4'-Methylenebis[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenol]
8	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₃ S	1,2-Naphthalenediol, 5,6,7,8-tetrahydro-6-[[6-[[2-[(2-methoxyphenyl)thio]ethyl]amino]hexyl]propylamino]
9	C ₂₆ H ₄₁ N ₄ O ₁₃	3-Amino-3-désoxy-β-D-glucopyranoside de (1S,2R,3S,4S,6R)-4,6-diamino-3-[(6-[(benzyloxy)carbonyl]amino)-6-désoxy-β-D-glucopyranosyl]oxy]-2-hydroxycyclohexyle

10	C ₄₄ H ₂₈ NO ₆	N-[3'-Hydroxy-6'-(1-naphthylmethoxy)-3-oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl]-4-biphenylcarboxamid
11	C ₄₃ H ₆₀ N ₃ O ₁₁	2-propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-, (3aR,4R,6S,7aR)-6-[[[4-[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-[[[4-(octyloxy)phenyl]amino]carbonyl]butyl]amino]carbonyl]hexahydro-6-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl ester, (2E)
12	C ₁₂ H ₁₇ NONa	Diethyl toluamide
13	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₄	Ethyl 6-(2-furyl)-2-hydroxy-4-methyl-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate
14	C ₁₆ H ₃₆ NO ₂	N-Lauryldiethanolamine
15	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	Dibutyl phthalate (plasticizer contaminant)
16	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ Na	Ethyl 1-(4-morpholinylcarbonyl)-4-piperidinecarboxylate
17	C ₂₄ H ₃₉ O ₄	Diocetyl phthalate (plasticizer contaminant)
18	C ₂₉ H ₃₁ NONa	5-(4-tert-butylphenyl)-2,2-dimethyl-1,3,5,6-tetrahydrobenzo[a]phenanthridin-4-one

A partir dos valores ambientais estimados, foram criados três grupos de exposição: grupo controle (0%); grupo I, exposto a 50% da concentração ambiental estimada (0,1%); grupo II, exposto a 100% da concentração ambiental estimada (0,2%) (MONTALVÃO et al., 2018). Cada grupo foi composto por 13 peixes. Os animais foram expostos ao EC por um período de 96 horas. Para a realização dos testes, os peixes foram mantidos individualmente em aquários medindo 30x40x50 cm, com 43 litros de água decolorada. Não houve a troca de água dos aquários durante a realização do experimento. Os animais foram aclimatados por 24 horas nos aquários, em isolamento.

2.3. Análises dos parâmetros biométricos

Os peixes foram medidos com um paquímetro e pesados com uma balança de precisão antes e depois do período de exposição ao EC para a análise de crescimento e ganho de peso. Ao final do período de exposição os peixes foram anestesiados com eugenol (1,6 µL L⁻¹) e, posteriormente, eutanasiados para a retirada do fígado para análise do Índice Hepatosomático (IHS) (peso do fígado/peso corporal x 100) (AL-GHASIS, 2013), e para a retirada de sangue, usado na confecção das lâminas sanguíneas para o teste de mutagenicidade.

2.4 Análises dos parâmetros comportamentais

Usou-se os mesmos grupos descritos no experimento biométrico e com o mesmo tempo de exposição. Os peixes foram colocados nos aquários um dia antes do início do experimento para aclimatação. Os peixes foram filmados no dia 1 (antes da adição do efluente de curtume), no dia 3 e dia 5, conforme o esquema apresentado na figura 1.

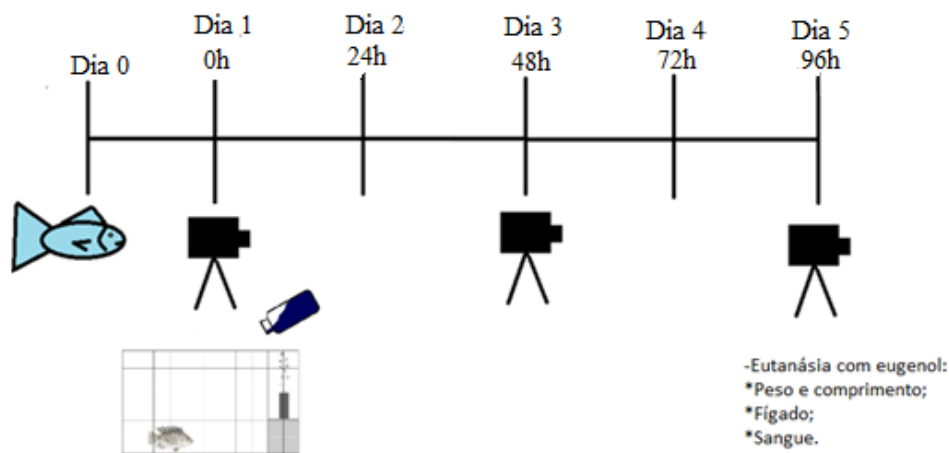


Figura 1. Esquema da duração do experimento e filmagens para análises comportamentais da exposição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a efluente de curtume.

2.4.1 Comportamento alimentar

No período da manhã colocava-se a filmadora na frente do aquário por um minuto para que o peixe se habituasse com sua presença. Após este período, colocava-se o alimento no aquário e filmava por 7 minutos para verificar a latência para alimentação. A quantidade de ração oferecida a cada peixe foi proporcional à 3% do seu peso, dividido em duas porções (uma oferecida na parte da manhã e a outra na parte da tarde).

2.4.2 Movimentação

Os aquários foram marcados com quadrantes de 5x5 cm na parte frontal. O objetivo destes quadrantes era auxiliar na aferição da distância percorrida por cada indivíduo. Os peixes foram filmados por 2 minutos, no período da manhã, após 30 minutos da realização do teste de alimentação. Além da distância percorrida, analisou-se o tempo que os peixes passavam se locomovendo.

2.4.3 Teste de habituação e exploração de um objeto estranho

Após a filmagem da movimentação dos peixes, introduzia-se um objeto não familiar aos peixes (“joelho” de encanamento PVC) e analisou-se a latência para os peixes se aproximarem do objeto e o tempo que cada peixe passou próximo ao objeto (distância mínima de 10 cm, marcada pelos quadrantes feitos na parte frontal do aquário) (GALHARDO et al., 2012). Neste teste, cada peixe foi filmado por 8 minutos após a introdução do objeto no aquário.

2.5 Análise das alterações nucleares em eritrócitos (Testes mutagênicos)

Para o teste mutagênico, retirou-se o sangue do coração dos peixes usando seringas e agulhas. O sangue foi misturado com o anticoagulante EDTA e, posteriormente, foi diluído em PBS. Em seguida, realizou-se a confecção das lâminas através da técnica de esfregaço. As lâminas foram fixadas em etanol por 10 minutos e coradas com Giemsa a 10% por 15 minutos (adaptado de WALIA et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2006).

Foram confeccionadas duas lâminas por animal e, em cada lâmina, contou-se mil células, totalizando 2.000 células por animal. Os danos mutagênicos analisados foram a frequência de micronúcleo e de outras anormalidades do núcleo (Figura 7). A contagem das células foi realizada em um microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes.

2.6 Análises estatísticas

Inicialmente foram retirados os valores considerados *outliers* dos resultados dos testes de biometria e dos testes comportamentais e, em seguida, foram realizados os testes de normalidade (Teste de Shapiro-Wilker) e homogeneidade de variância (Teste de Bartlett) dos dados. Os dados dos testes biométricos e de mutagenicidade que apresentaram normalidade e homogeneidade foram analisados pelo teste de ANOVA one-way. Nos casos em que os dados não apresentaram esses pressupostos, usou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Já para os dados comportamentais, usou-se a ANOVA two-way para os dados com normalidade e homogeneidade, e o teste semi-paramétrico da ANOVA ranqueada para a análise dos dados não-paramétricos. Com a concentração do EC sendo considerado o fator 1 (3 níveis: 0%, 0,1% e 0,2%) e o tempo de exposição como fator 2 (3 níveis: 0h, 48h e 96h).

O teste de média utilizado foi o LSD, pois o coeficiente de variação de todos os resultados ficou acima de 20%. Adotou-se $p < 0,05$ como sendo o nível de significância. Todos os cálculos foram feitos no software livre R (R Team Core, 2017).

2.7 Questões éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, com protocolo nº 3088020216.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros biométricos

Não houve efeito do efluente de curtume sobre o ganho de peso dos peixes, conforme a figura 2-A ($H(2) = 3,6371$; $p=0,16$) e sobre o crescimento ($F(2,36) = 0,1367$; $p=,87$), conforme figura 2-B, durante as 96 horas de exposição ao poluente. Contudo, outros estudos em peixe, com maiores períodos de exposição de poluentes, mostram alterações em parâmetros biométricos. Gbem et al. (2003), por exemplo, relataram que a exposição por 8 semanas ao efluente de curtume reduziu o ganho de peso em *Clarias garipinus*. Almeida et al. (2009) verificaram tilápias-do-Nilo expostas ao cádmio (um dos metais pesados presentes no efluente de curtume) por 15 dias tiveram redução na taxa de crescimento. Parâmetros como o crescimento e ganho de peso podem indicar mudanças bioquímicas e/ou metabólicas em organismos expostos à contaminantes (ALMEIDA et al., 2009; GBEM et al., 2003). Porém, o tempo de exposição e/ou as concentrações usadas no presente estudo não causaram alterações nestes parâmetros.

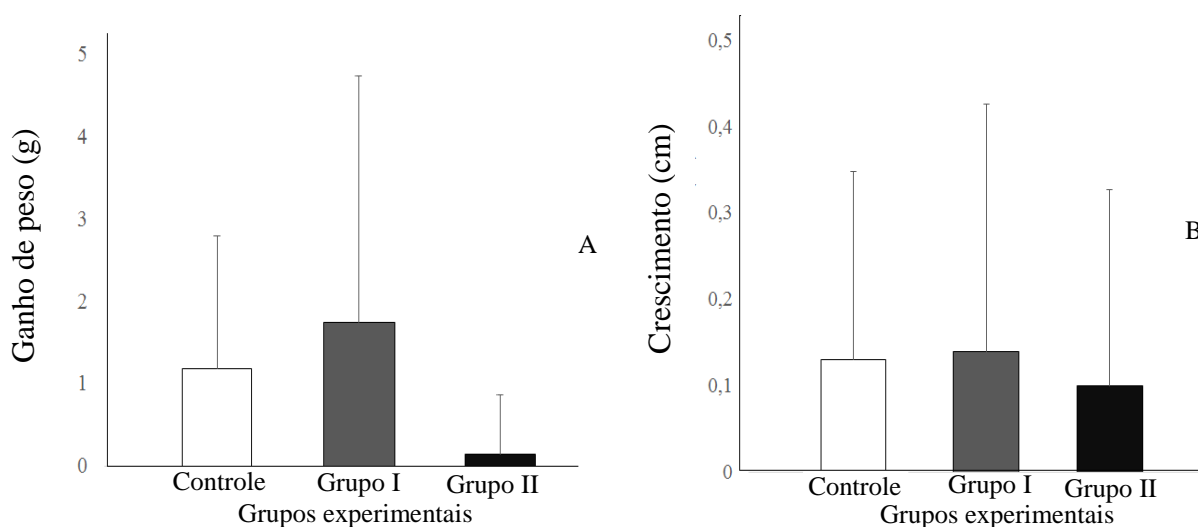


Figura 2. Efeitos do efluente de curtume sobre o ganho de peso (A) e crescimento (B) da tilápia-do-Nilo exposta ao efluente de curtume por 96 horas (Média ± DP).

A análise do IHS também não apresentou alterações ($F(2,36) = 0,0428$; $p=0,95$) (Figura 3). Embora o IHS não tenha demonstrado alterações, estudos têm relatado que a exposição em períodos maiores ao efluente de curtume causam danos histológicos, como necrose, no fígado de peixes como *Channa punctatus* exposto ao efluente de curtume por 29 dias (MOHANTA et al., 2010) e *Oreochromis mossambicus*, exposta a diferentes concentrações de efluente de curtume por 60 dias (NAVARAJ & YASMIN, 2012).

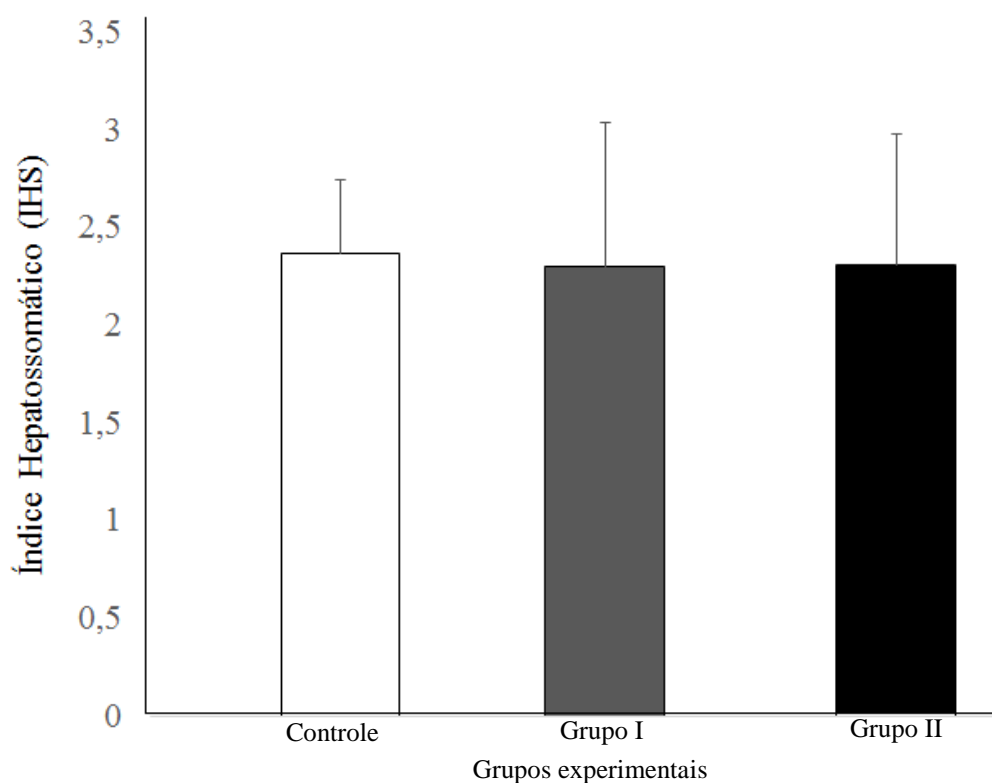


Figura 3. Índice Hepatosomático de *Oreochromis niloticus* exposta ao efluente de curtume por 96 horas (Média \pm DP).

3.2 Parâmetros comportamentais

Em relação ao comportamento alimentar, verificou-se que os peixes de todos os grupos reduziram a latência para a alimentação, ao longo do período avaliado. Assim, o efeito encontrado foi apenas do tempo de execução do estudo ($F(2, 108) = 27,6698$, $p<0,01$) e não da exposição ao efluente de curtume ($F(2, 108) = 0,1000$, $p=0,90$) (Figura 4). O resultado foi diferente do encontrado por Gbem et al. (2003), em que os peixes da espécie *Clarias guriepinus*,

expostos ao efluente de curtume por 8 semanas, apresentaram redução das atividades físicas, especialmente no comportamento alimentar.

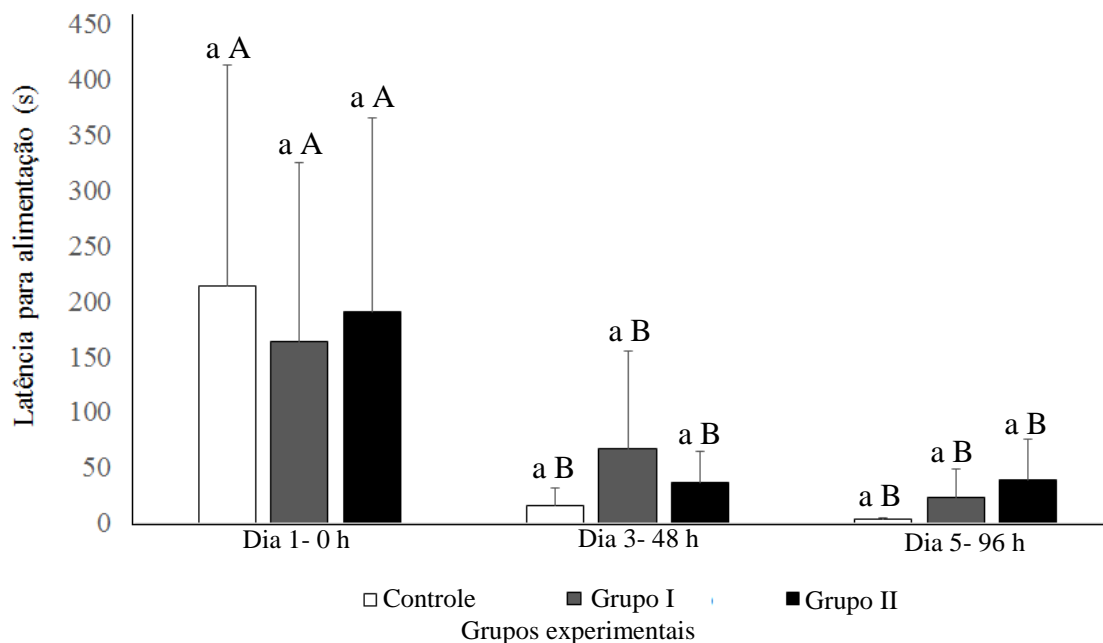


Figura 4. Latência para alimentação de *Oreochromis niloticus* exposta a diferentes concentrações de efluente de curtume por 96 horas. Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias (Média ± DP).

Foi observado que o a distância percorrida pelos peixes foi significativamente diferente no último dia de exposição ao efluente (Fator 1-(F (2, 108) =3,4070, p=0,03); Fator 2-(F (2, 108) =2,0651, p=0,13); Interação entre os fatores-(F (4,108) =0,5621, p=0,69)). Porém, como o grupo controle apresentou um valor intermediário, quando comparado com os grupos expostos ao efluente de curtume ao grupo controle, observou-se que não houve diferença entre os grupos (Figura 5-A). Também não foram observadas alterações no tempo de movimentação entre os peixes dos diferentes grupos (Fator 1-(F (2, 108) =0,06); Fator 2-(F (2, 108) =1,8832, p=0,15); Interação entre os fatores-(F (4,108) =0,0717; p=0,99)) (Figura 5-B). Outros estudos apontam efeitos no comportamento natatório de peixes expostos a poluentes por períodos prolongados. Alterações na natação de *Cyprinus carpio*, como movimentos agitados e aleatórios e natação com o abdome para cima, devido à exposição a diferentes concentrações

(10% a 70%) de efluente de curtume por 96 horas foram relatadas por Ganeshwade et al. (2006). Navaraj & Yasmin (2012) também relataram alterações na natação de *Oreochromis mossambicus* expostos ao efluente de curtume por 60 dias. Vieira et al. (2009) verificou que a exposição de *Pomatochistus microps* a concentrações a partir de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (metal pesado presente no efluente de curtume) e a concentrações a partir de 3,125 mercúrio $\mu\text{g L}^{-1}$, por 96 horas, tiveram menor resistência em nadar contra o fluxo de água, e a distância percorrida pelos peixes expostos foi menor quando comparado com os peixes não expostos. Honda et al. (2008) também verificaram a redução das atividades locomotoras em *Brycon amazonicus* expostos a 9,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio (outro metal presente no efluente de curtume) por 96 horas. As diferenças no período de exposição, nas concentrações utilizadas por estes autores e pelo fato de eles testarem os metais pesados isolados podem ser os motivos prováveis pelos quais não se obteve um resultado semelhante neste estudo. Estudos sobre os efeitos de contaminantes sobre a capacidade de locomoção são importantes, uma vez que comportamentos mais complexos que garantem na sobrevivência dos animais na natureza, como captura de alimento e fuga de predadores, dependem prioritariamente da capacidade de locomoção dos organismos (TIERNEY, 2011; VIEIRA et al., 2009).

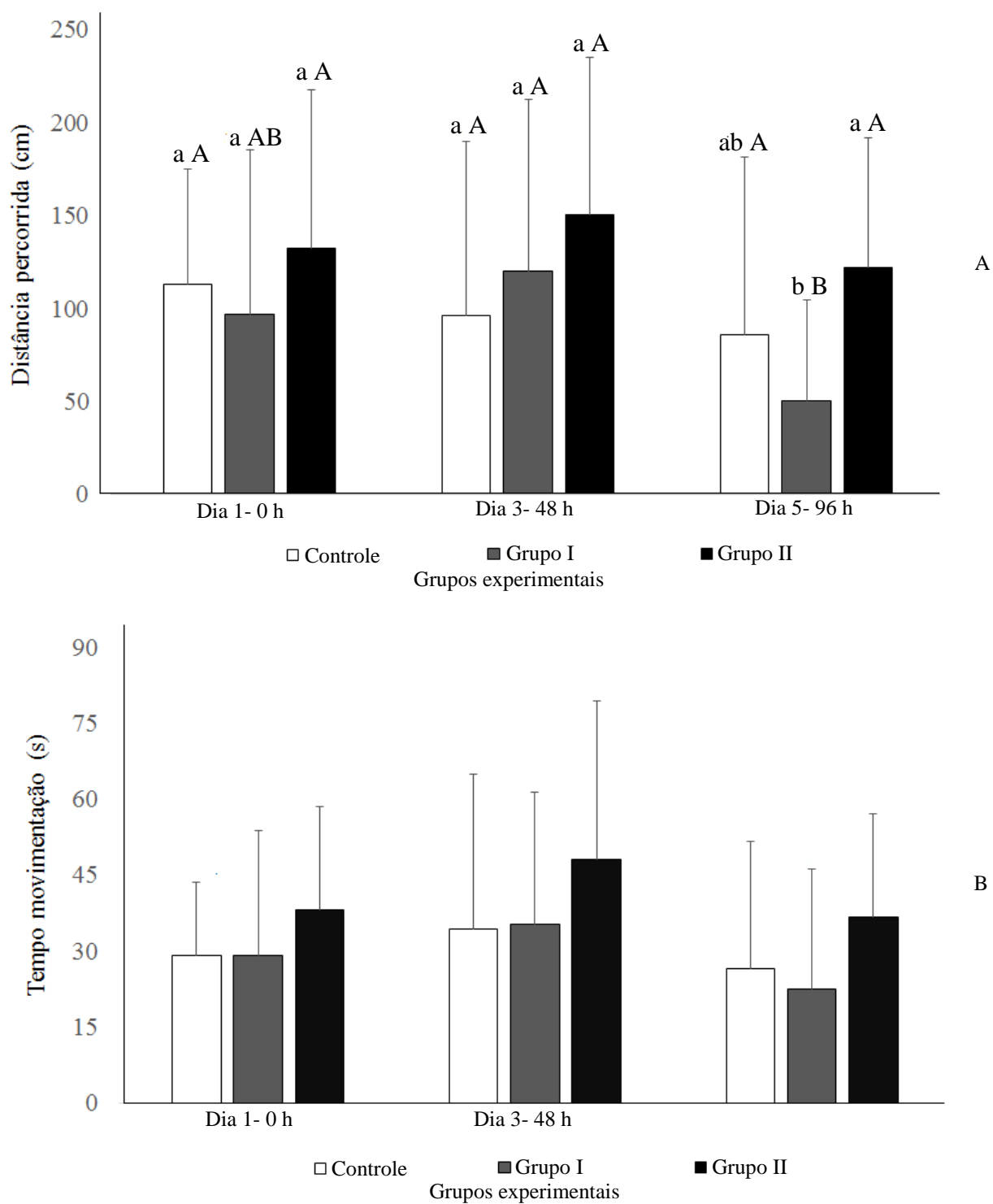


Figura 5. Efeitos da exposição de *Oreochromis niloticus* ao efluente de curtume sobre a distância percorrida (A) e o tempo em movimentação (B). Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias (Média ± SD).

A capacidade de explorar novos objetos foi avaliada através do teste do objeto estranho. Neste teste não houve diferença estatística entre os grupos em relação à latência para se aproximar do objeto estranho (Fator 1-(F (2, 108) =1,8679, p=0,15); Fator 2-(F (2, 108) =0,7124, p=0,49); Interação entre os fatores-(F (4,108) =0,1362, p=0,96)) (Figura 6-A). Porém, ao analisar o tempo que os peixes passaram perto do objeto, constatou-se que houve uma variação ao longo dos dias do experimento, em que os peixes do grupo controle e do grupo I (50% da concentração ambiental estimada) apresentaram um aumento no tempo próximo ao objeto. Já no grupo II (100% da concentração ambiental estimada) o tempo que os peixes passaram próximo ao objeto não variou ao longo do experimento, indicando que os peixes deste grupo não se habituaram à presença do objeto, ou seja, a exposição à concentração ambiental estimada do efluente de curtume pode afetar o tempo de exploração de um objeto novo nos peixes (Fator 1-(F (2, 108) =0,6269, p=0,53); Fator 2-(F (2, 108) =4,7379, p=0,01); Interação entre os fatores-(F (2,2,4,108) = 0,5537, p=0,69)) (Figura 6-B). O teste do objeto estranho foi utilizado para avaliar a reação ao objeto novo e indicar, entre outros aspectos, a capacidade de exploração ambiental em uma situação nova e com potencial risco ao animal (o novo objeto pode ser visto como um predador) (RÉALE et al., 2007). Entretanto, a repetição do teste pode levar à habituação por parte do animal à presença do objeto, uma vez que o objeto não apresentou risco, como foi observado no grupo controle e no grupo I. Contudo, uma vez que o grupo II não se habituou à presença do objeto estranho, é plausível supor que houve alteração na percepção ambiental. Outra possibilidade é que o efluente de curtume tenha efeito na memória dos peixes, uma vez que o grupo II não se habitou ao objeto estranho. Rabelo et al. (2016) e Silva et al. (2016) verificaram que camundongos expostos ao efluente de curtume apresentaram déficit de memória. Assim, novos estudos que realizem testes de memória poderão investigar a hipótese de o efluente de curtume causar déficit de memória em peixes.

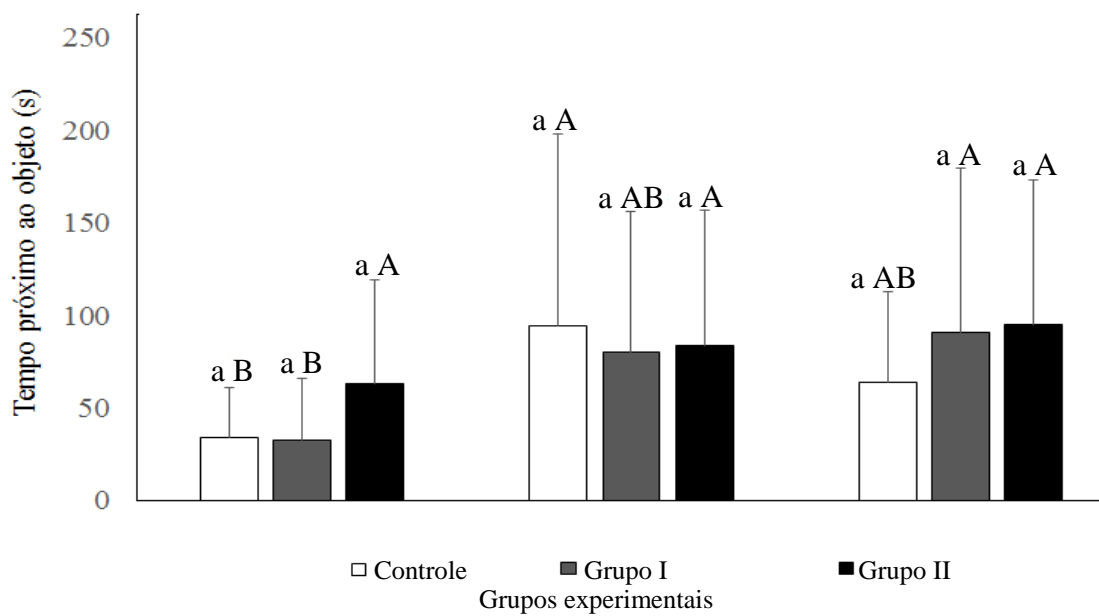
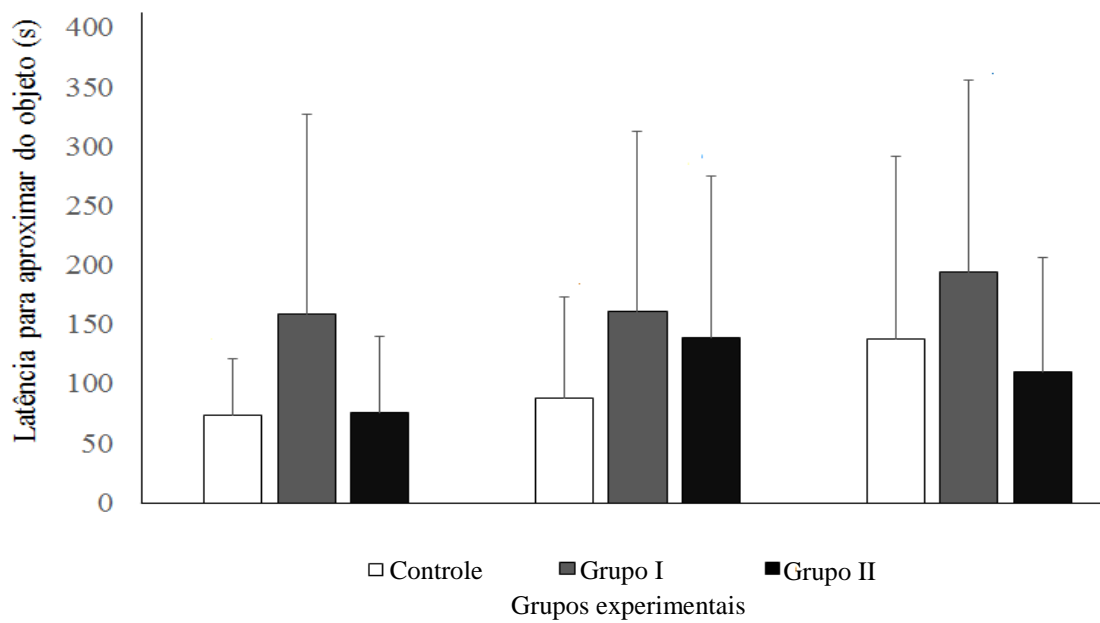


Figura 6. Teste do objeto estranho em *Oreochromis niloticus* exposta por 96 horas a concentrações de efluente de curtume. Latência para se aproximar do objeto estranho (A) e tempo que os peixes passaram perto do objeto estranho (B). Letras minúsculas comparam os grupos em um mesmo dia. Letras maiúsculas comparam um mesmo grupo entre os dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos e os dias (Média ± DP).

3.3 Testes mutagênicos

A mutagenicidade do efluente de curtume do tipo *wet blue* para a tilápia-do-Nilo foi testada através do teste de micronúcleo e do teste de anormalidades nucleares. As frequências das anormalidades totais foram analisadas, e apresentaram resultado estatisticamente significativo. O grupo controle positivo apresentou maior frequência de anormalidade totais, seguido pelo grupo II. Já o grupo controle negativo apresentou a menor frequência de anormalidades nucleares, e o grupo I teve um resultado intermediário entre o controle negativo e o grupo II ($H(3) = 21,824$; $p=0,00$) (Figura 8-A). De modo geral, o aumento da frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares demonstraram a capacidade do efluente de curtume de causar danos mutagênicos em peixes. Danos no material genético podem levar à morte celular ou desencadear o surgimento de cânceres (BONASSI et al., 2007; FENECH et al., 1999), prejudicando a qualidade de vida e sobrevivência dos organismos expostos ao efluente de curtume.

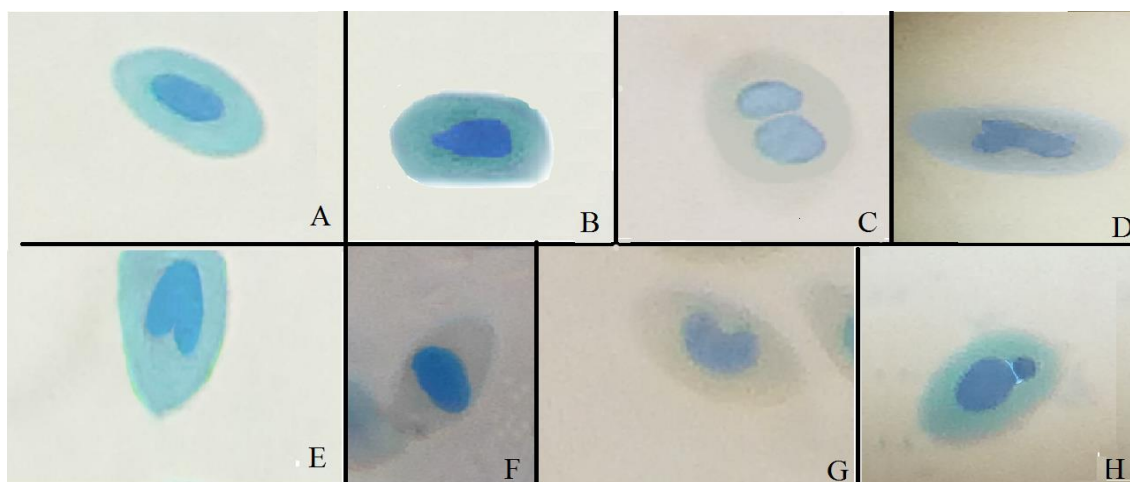


Figura 7. Anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*: Eritrócito com núcleo normal (A). Núcleo com broto (B). Célula binucleada (C). Núcleo lobulado (D). Núcleo entalhado (E). Núcleo deslocado (F). Núcleo riniforme (G). Micronúcleo (H).

Houve diferença estatística em relação à frequência de núcleos com brotos (figura 7-B). Porém, a diferença foi observada apenas no grupo controle positivo ($H(3) = 17,679$; $p=0,00$) (Figura 8-B). Walia et al. (2013) encontraram um resultado diferente deste, em que peixes da

espécie *Labeo rohita* expostos a concentrações de 0,88%, 1,76% e 3,53% de efluente de curtume por 24, 48, 72 e 96 horas apresentaram maior número de células com núcleos com broto. Özkan et al. (2011) também relatou o aumento de células com essa anormalidade nuclear em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de cádmio (um dos componentes do efluente de curtume). As concentrações mais elevadas relatadas por esses autores podem explicar a diferença nos resultados encontrados.

Já na contagem de células binucleadas (figura 7-C) não houve diferença entre os grupos (H (3) = 1,9218; p=0,58) (Figura 8-C). Praveena et al. (2014) relataram o aumento de células binucleadas em *Labeo rohita* expostos por 7 e 30 dias a 1/10 da CL₅₀ de cromo. Segundo esses autores, células binucleadas surgem da divisão celular anormal, devido à inibição da citocinese.

Em relação à presença de núcleos lobulados (figura 7-D) os dados indicaram que os peixes expostos à concentração ambiental (grupo II- 100%) do efluente de curtume e do controle positivo tiveram maior frequência desta anormalidade do que os peixes não expostos. Os peixes do grupo de exposição I apresentaram valor intermediário entre o controle negativo e o grupo II (H (3) = 13,419; p<0,01) (Figura 8-D). Um aumento de frequência de células com núcleo lobulado também foi encontrado em *Labeo rohita* exposto ao efluente de curtume (WALIA et al., 2013). Componentes metálicos do efluente, como o cádmio e o chumbo, aumentaram a frequência de células com núcleo lobulado em *Oreochromis niloticus* (ÖZKAN et al.,2011) e em *Prochilodus lineatus* (MONTEIRO et al.,2011), respectivamente.

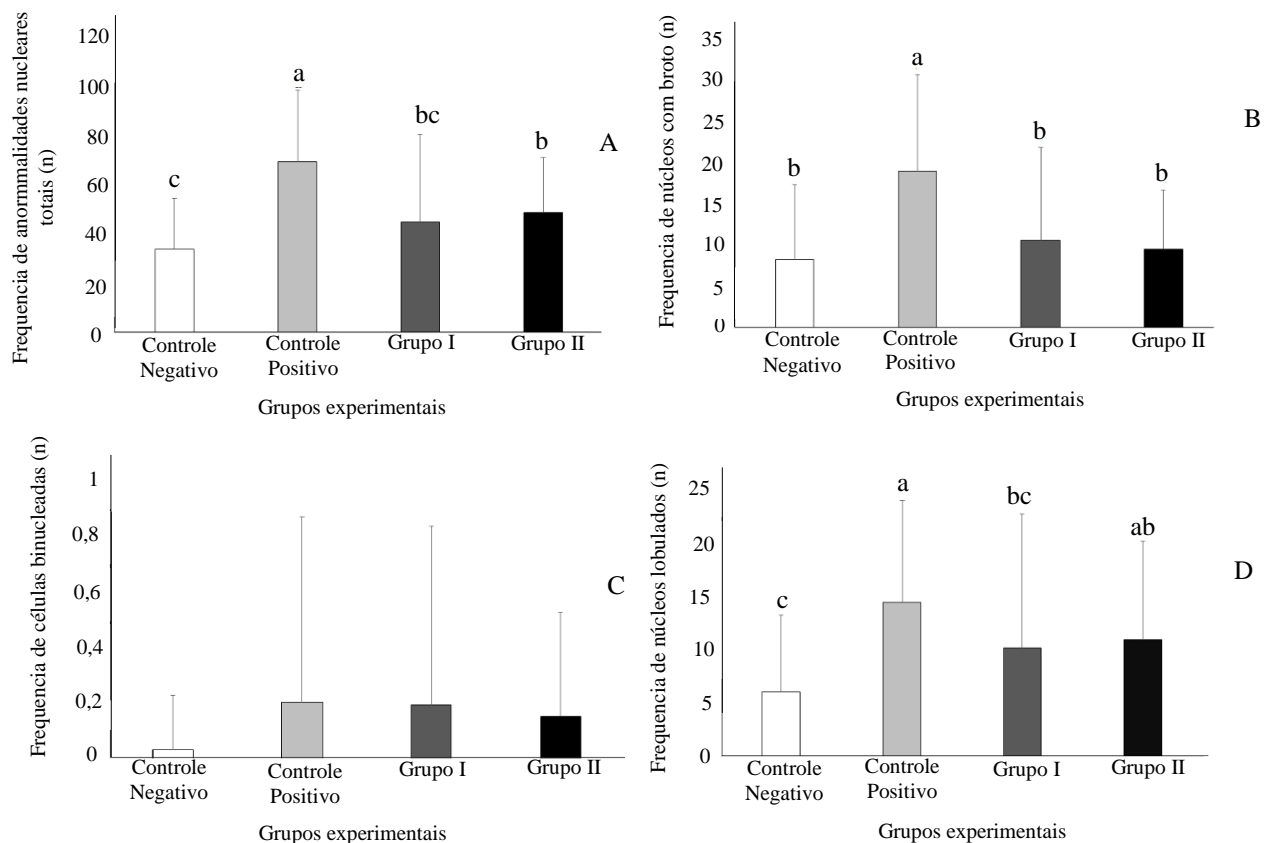


Figura 8. Frequência de anormalidades nucleares totais de *Oreochromis niloticus* dos grupos expostos ao efluente de curtume por 96 horas e dos grupos controle negativo e positivo (A). Frequência de núcleos com broto nos diferentes grupos testados (B). Frequência de células binucleadas (C). Frequência de núcleos lobulados (D) (Média \pm DP).

Também foram encontrados resultados significativos para a frequência de núcleos entalhados (figura 7-E). Porém, assim como ocorreu com a frequência de núcleos com brotos, a diferença foi observada apenas no controle positivo ($H(3) = 10,277$; $p=0,01$) (Figura 9-A). A capacidade do efluente de curtume em aumentar a frequência de células com núcleos entalhados em *Labeo rohita* foi relatada por Walia et al. (2011). Contudo, as concentrações usadas por esses autores foram maiores (0,88%, 1,76% e 3,53%) do que as concentrações usadas no presente estudo.

Os peixes expostos à concentração ambiental de efluente de curtume (0,2%) apresentaram maior quantidade de células com núcleos deslocados (figura 7-F) do que os demais grupos. Contudo, não houve diferença entre o grupo controle e o grupo I, e o controle positivo apresentou o menor valor para essa anormalidade ($H(3) = 31,992$; $p>0,00$) (Figura 9-B). Um resultado que chamou a atenção foi o fato de que a substância usada como controle

positivo (a ciclofosfamida) apresentou menor frequência de células com núcleo deslocado. Sabe-se que a ciclofosfamida é uma substância clastogênica (PACHECO & SANTOS, 1997), o que pode sugerir que núcleos deslocados são causados por outros mecanismos, sendo necessários mais estudos relacionados a esta anomalia. Além disso, a ocorrência de núcleos deslocados é pouco descrita na literatura. Souza et al. (2017) encontraram esta anormalidade em periquitos *Melopsittacus undulates* expostos a 5% de efluente de curtume por 60 dias e sugeriram que seu surgimento está relacionado com danos nas estruturas que mantem o núcleo no centro da célula, como o citoesqueleto. Porém, novos estudos são necessários para melhor compreensão sobre as possíveis causas para o surgimento de células com núcleos deslocados e a relação com o efluente de curtume.

Também houve diferença significativa para a frequência de células com núcleo riniforme (figura 7-G). O grupo controle positivo e o grupo II apresentaram maior frequência de células com esta anormalidade nuclear. O grupo controle negativo apresentou valores mais baixos, e o grupo I teve uma frequência intermediária entre o grupo controle e o grupo 100% ($H(3) = 12,440$; $p=0,00$) (Figura 9-C). A presença de células com núcleo riniforme, devido à exposição a poluentes, é pouco relatada em peixes. Porém, Monteiro et al. (2011) encontraram um maior número de células com essa anormalidade em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos a 5 mg L^{-1} de chumbo por 6, 24 e 96 horas.

Houve diferença significativa na frequência de micronúcleos (Figura 7-H) entre os grupos. Peixes do grupo controle positivo apresentaram maior frequência de células com micronúcleo. Entre os grupos expostos ao efluente de curtume, os peixes do grupo I apresentaram maior frequência de células com micronúcleo, enquanto que o grupo II não apresentou diferença em relação ao grupo controle negativo ($H(3) = 27,707$; $p=0,00$) (Figura 9-D). Matsumoto et al. (2006) também relatou o aumento da frequência de micronúcleos em células de *Oreochromis niloticus* expostas por 72 horas a água diluída (1:1) de um rio que recebia efluente de curtume. O aumento de células com micronúcleo causado pela exposição ao efluente de curtume também foi relatado em outras espécies de peixes, como *Labeo rohita* (WALIA et al., 2015). Estudos com metais que estão presentes na mistura do efluente de curtume, como o cromo e o cádmio, têm demonstrado o aumento da frequência de micronúcleos em peixes (LEMOS et al., 2001; ÖZKAN et al., 2011; PRAVEENA et al., 2014). Belin et al. (2016) verificaram que a exposição de *Oreochromis niloticus* a um composto orgânico identificado neste efluente de curtume (o plastificante di-n-butyl phthalate- DBP) por 24 e 96 horas também causou o aumento de micronúcleo e anormalidades nucleares. Contudo, o

efluente de curtume é uma mistura complexa, de modo que os efeitos mutagênicos podem ser causados por metais pesados e, também, pelos seus componentes orgânicos (que são pouco conhecidos) ou pela interação dos componentes presentes neste efluente. Micronúcleos são fragmentos de cromossomos formado pela sua quebra (efeito clastogênico) ou cromossomos inteiros que não participaram corretamente da anáfase (efeito aneugênico), formando um pequeno núcleo extra (PRAVEENA et al., 2014; WALIA et al., 2015; FENECH et al., 1999). A ocorrência de micronúcleos (e também de anormalidades nucleares) também está relacionada com a reação de radicais livres com o material genético (AHMAD et al., 2006). Assim, metais pesados estão associados com a ocorrência de estresse oxidativo, que aumenta a quantidade de radicais livres (DI GIULIO et al., 1995). Além da produção de radicais livres, Moysés et al. (2017), ao expor *Drosophila melanogaster* ao efluente de curtume por 72 horas, verificou que esse poluente também alterou o sistema de enzimas antioxidante, como a redução da atividade de Glutathione S-transferase, contribuindo para o desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes, resultando em danos ao material genético.

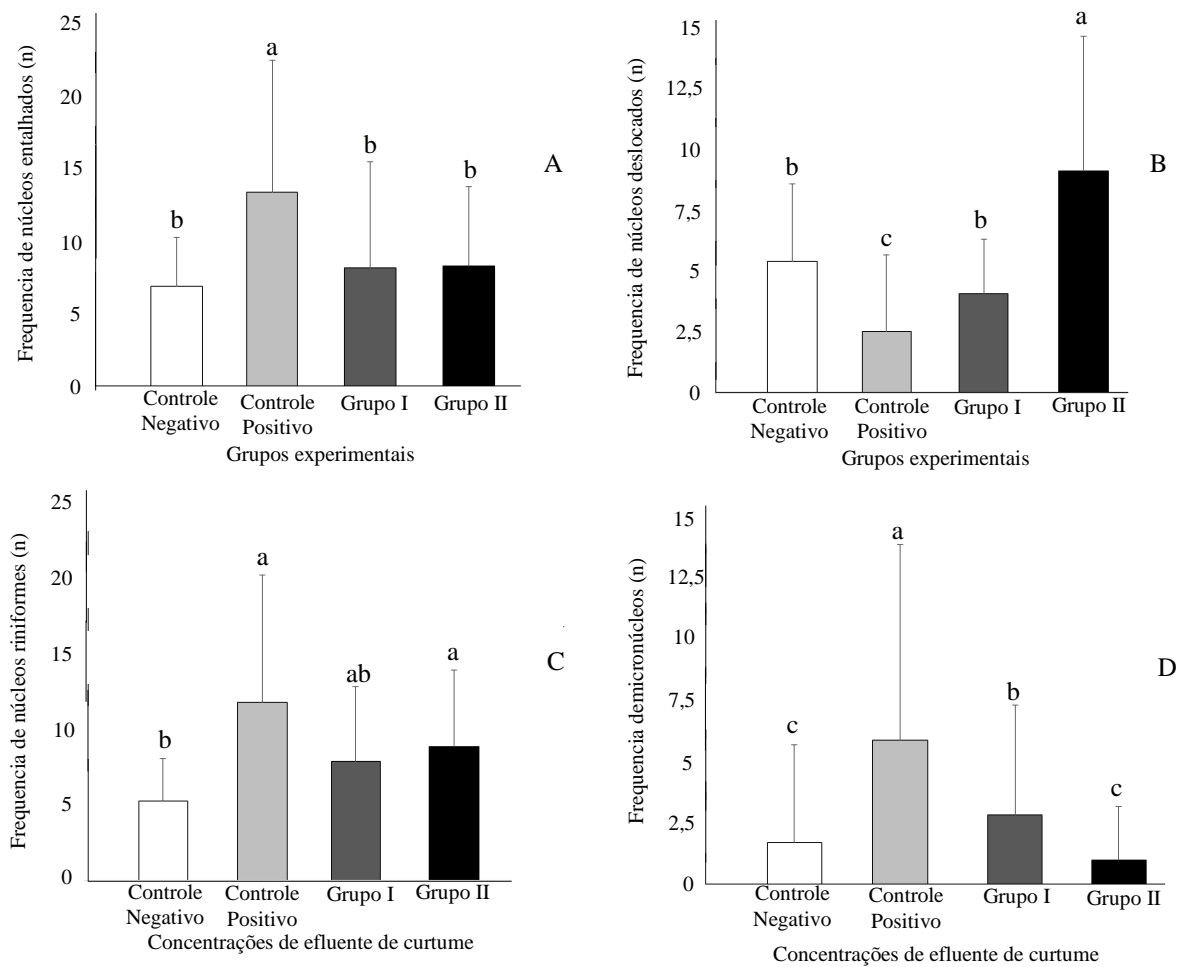


Figura 9. Frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* nos grupos expostos e não expostos ao efluente de curtume por 96 horas. Frequência de núcleos entalhados (A). Frequência de núcleos deslocados (B). Frequência de núcleos riniformes (C). Frequência de micronúcleos (D) (Média \pm DP).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o efluente de curtume, nas concentrações ambientalmente relevantes, não causou danos aos parâmetros biométricos e no comportamento alimentar e movimentação da tilápia-do-Nilo. Porém, a exposição ao EC alterou a capacidade de exploração ambiental, aferido pelo teste de objeto estranho. Além disso, a capacidade deste poluente de causar alterações cromossômicas foi evidenciada pelo aumento da frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares nas células dos peixes expostos. Assim, o efluente de curtume, quando lançado no meio ambiente de forma incorreta, causa toxicidade na tilápia-do-Nilo, o que pode interferir em processos biológicos vitais para a sobrevivência dos organismos na natureza.

5. REFERÊNCIAS

- Ahmad I, Maria VL, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. *Mutat. Res.* 608, 16-28, 2006.
- Almeida J A, Barreto RE, Novelli ELB, Castro FJ, Moron SE. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotropical Ichthyology.* 7 (1), 103-108, 2009.
- Al-Ghais SM. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin.* 74, 183-18, 2013.
- Benli AÇK, Erkmén B, Erkoç F. Genotoxicity of sub-lethal di-n-butyl phthalate (DBP) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 67 (1), 25-30, 2016.
- Brito GA. Impactos ambientais gerados pelos curtumes. 9º Colóquio de Moda, Fortaleza (CE), 2013.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 28 (3), 625- 631, 2007.
- Carvalho C de F, Ferreira AL, Stapelfeldt F. Qualidade das águas do ribeirão Ubá- MG. *Revista Esc. Minas.* 57 (3), 165-172, 2004.
- Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, Van Veld PA. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Gary, M., Rand, P.D. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, second ed. Taylor and Francis, Washington, pp. 545–548, 1995.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project- Na international collaborative study on the use of the micronucleus technique for mensuring DNA damage in humans. *Mutation Research.* 428, 271-283, 1999.

Galhardo L, Vitorino A, Oliveira RF. Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biology Letters*. 8, 936-938, 2012.

Ganem, R.S. Curtumes: aspectos ambientais. 2007. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1281/curtumes_aspectos_senna.pdf?sequence=1>. Acesso em: 20 maio 2017.

Ganeshwade RM, Rokade PB, Sonwane SR. Behavioral responses of *Cyprinus carpio* to industrial effluents. *Journal of Environmental Biology*. 27 (1), 159-160, 2006.

Gbem TT et al. Trace metal accumulation in *Clarias gariepinus* (Teugels) exposed to sublethal levels of tannery effluent. *The Science of the Total Environment*. 271 (1), 1-9, 2001.

Gbem TT, Balogun JK, Lawal FA, Annune PA, Auta J. Sublethal effects of tannery effluent on some hematological indices and growth of *Clarias gariepinus* (Teugels). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 71, 1200-1206, 2003.

Godecke MV, Rodrigues MAS, Naime RH. Resíduos de curtume: estudo das tendências de pesquisa. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. 7 (7), 1357-1378, 2012.

Guimarães ATB, Ferreira R de O, Rabelo LM, Silva BC e, Souza JM de, Silva WMA da, Menezes IPP de, Rodrigues AS de L, Vaz BG, Costa DR de O, Pereira I, Silva AR da, Malafaia G. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents show object recognition deficits. *Chemosphere*. 164, 593-602, 2016.

Honda RT, Fernandes-de-Castilho M, Val AL. Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Aquatic Toxicology*. 89, 204-206, 2008.

Lemos CT de, Rondel PM, Terra NR, Erdtmann B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (6), 1320-1324, 2001.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malaguittii MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetic and Molecular Biology*. 29 (1), 148-158, 2006.

Mohanta MK, Salam MA, Saha AK, Hasan A, Roy AK. Effects of tannery effluent on survival and histopathological changes in different organs of *Channa punctatus*. Asian Journal Exp. Biol. Sci. 1 (2), 294-302, 2010.

Montalvão MF, Castro AL da S, Rodrigues AS de L, Mendes B de O, Malafaia G. Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. Science of the Total Environment. 610-611, 1595-1606, 2018.

Monteiro V, Cavalcante DGSM, Viléla MBFA, Sofia SH, Martinez CBR. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Aquatic Toxicology. 104, 291-298, 2011.

Moraes DS de L, Jordão BQ. Degradação dos recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista Saúde Pública. 36 (3), 370-374, 2002.

Moysés F dos S, Bertoldi K, Lovatel G, Vaz S, Ferreira K, Junqueira J, Bargatini PB, Rodrigues MAS, Xavier LL, Siqueira IR. Effects of tannery wastewater exposure on adult *Drosophila melanogaster*. Environ Sci Pollut Res. 24, 2638-26395, 2017.

Murugesan AG, Ramathilaga a, Samson Ponselvan JK, Dinakaran Michael R. Immunotoxicity of tannery effluent to the freshwater fish *Cyprinus carpio*. Bull Environ Contam Toxicol. 88, 639-643, 2012.

Naravaj PS, Yasmin J. Toxicological evaluation of tannery industry waste water on *Oreochromis mossambicus*. African Journal of Environmental Science and Technology. 6 (9), 331-336, 2012.

Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Özlüer Hunt A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. Turk J Zool. 35 (4), 585-592, 2011.

Pacheco M, Santos MA. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile Eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology and environmental safety. 38, 252-259, 1997.

Praveena M, Sailaja MC, Rao KJ. Clastogenic effects induced due to chromium intoxication in a fresh water fish, *Labeo rohita* (Hamilton). International journal of advanced scientific and technical research. 4 (1), 647-656, 2014.

- Qadir A, Malik RN. Heavy metals in eight edible fish species from two polluted tributaries (Aik and Palkhu) fo the river Chenab, Pakistan. *Biol Trace Elem Res.* 143, 1524-1540, 2011.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. Disponível em <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 de out. 2017.
- Rabelo LM, Silva BC e, Almeida SF de, Silva WMA da, Mendes B de O, Guimarães ATB, Silva AR da, Castro AL da S, Rodrigues AS de L, Malafaia G. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and Teratology.* 55, 45-49, 2016.
- Réale D, Reader SM, Sol D, McDougall PT, Dingemanse NJ. Integrating animal temperamento within ecology and evolution. *Biol. Rev.* 82, 291-318, 2007.
- Scott GR, Sloman KA. The effects of evironmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology.* 68, 369-392, 2004.
- Silva HSVP da, Loiola C, Pereira SRF, Santos RL, Andrade GV, Nunes GS. Toxicologia aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600 BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). *Pesticidas: revista Ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba.* 23, 1-10, 2013.
- Silva SVS, Dias AHC, Dutra ES, Pavani AL, Morelli S, Pereira BB. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: 10.1080/15287394.2015.1099484, .01-09, 2015.
- Silva WMA da, Mendes B de O, Guimarães ATB, Rabelo LM, Ferreira R de O, Silva BC e, Souza JM de, Menezes IPP de, Rodrigues AS de L, Malafaia G. Dermal exposure to tannery effluent causes neurobehavioral changes in C57B1/6J and Swiss mice. *Chemospheres.* 160, 237-243, 2016.
- Souza JM de, Montalvão MF, Silva AR da, Rodrigues AS de L, Malafaia G. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere.* 175, 521-533, 2017.
- Tierney KB. Behavioral assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1812, 381-389, 2011.

Vieira LR, Gravato C, Soares AMUM, Morgado F, Guilhermino L. Acute effects of copper and Mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*. 76, 1416-1427, 2009.

Walia Gk, Handa D, Kaur H, Kalotra R. Erythrocyte abnormalities in a freshwater fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 3 (1), 287-295, 2013.

Walia GK, Handa D, Kaur H, Kalotra R. Ecotoxicological studies on fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent by using micronucleus test. *Nucleos*. 58 (2), 111-116, 2015.

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que o efluente de curtume do tipo *wet blue* apresenta toxicidade para *Oreochromis niloticus*, causando alterações em parâmetros biométricos, comportamentais e mutagênicos. Assim, o descarte ilegal ou sem tratamento adequado deste poluente nos corpos hídricos pode interferir em processos biológicos vitais para a sobrevivência desses organismos na natureza, sendo plausível sugerir que estes efeitos interferem em aspectos ecológicos que podem reduzir as populações de peixes.

Embora este estudo tenha contribuído para a geração de novos conhecimentos sobre os efeitos da exposição de peixes ao EC sob diversos parâmetros, sugere-se a realização de novos estudos, que visem esclarecer os mecanismos que levam a alterações comportamentais e diferentes anormalidades nucleares em peixes expostos a esse poluente.