



**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus
Urutaí**

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

**INGESTÃO DE EFLUENTE DE CURTUME
COMO UM FATOR DE RISCO À SAÚDE
DAS AVES: UM ESTUDO TOXICOLÓGICO
UTILIZANDO *Coturnix coturnix japonica*
COMO SISTEMA MODELO**

Douglas Marcel dos Reis Sampaio

Orientador: Prof. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Urutaí, Março de 2019



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

Urutaí, Março de 2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SSA192
i Sampaio, Douglas Marcel dos Reis
Ingestão de efluente de curtume como um fator de
risco a saúde das aves: Um estudo toxicológico
utilizando Coturnix coturnix japônica como sistema
modelo / Douglas Marcel dos Reis Sampaio; orientadora
Aline Sueli de Lima Rodrigues; co-orientador
Guilherme Malafaia Pinto. -- Urutaí, 2019.
66 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação
em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) --
Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2019.

1. Resíduos agroindustriais. 2. Ecotoxicologia. 3.
Aves. 4. Poluição aquática. 5. Codornas Japonesas. I.
Sueli de Lima Rodrigues, Aline, orient. II. Malafaia
Pinto, Guilherme, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Douglas Marcel dos Reis Sampaio

Matrícula: 2017101330940220

Título do Trabalho: Ingestão de efluente de curtume

como um fator de risco à saúde das aves: um estudo toxicológico utilizando *Coturnix coturnix japônica* como sistema modelo

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 14/06/2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:


- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 14/06/2019.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



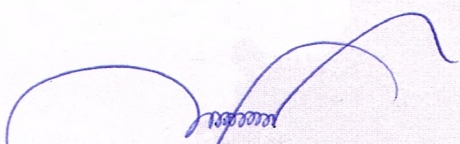
Assinatura do(a) orientador(a)

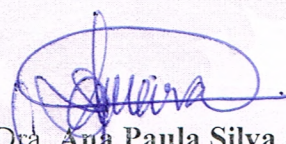


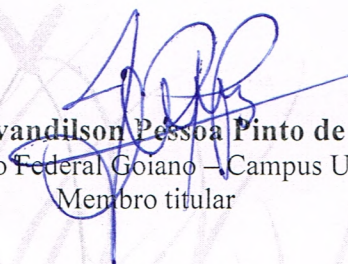
FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

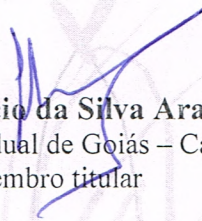
Título da dissertação:	<i>Sugestão de efluente de cunhuras como um fator de risco à saúde das aves: um estudo toxicológico utilizando do <u>Coturnix coturnix japonica</u> como sistema modelo</i>
Orientadora:	Profª. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues
Autor:	Douglas Marcel dos Reis Sampaio

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **21 de março de 2019**, 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. **Guilherme Malafaia**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Profª. Dra. **Ana Paula Silva Siqueira**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof. Dr. **Márcio da Silva Araújo**
Universidade Estadual de Goiás – Campus Ipameri
Membro titular

DOUGLAS MARCEL DOS REIS SAMPAIO

**INGESTÃO DE EFLUENTE DE CURTUME COMO
UM FATOR DE RISCO À SAÚDE DAS AVES: UM
ESTUDO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO *COTURNIX*
COTURNIX JAPONICA COMO SISTEMA MODELO**

Orientador

Prof. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

Coorientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto

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)
2019

*“A Deus, Pai Santo, Pai querido, Pai amado . A toda a minha família, se eu tivesse a oportunidade de viver outra vez, eu só ia querer se fosse com vocês.
In memorian Ana Laura Sampaio
In memorian Dyogo
Aos orientadores que decidiram acreditar em mim quando ninguém quis sequer me dar uma chance, Aline e Guilherme
Ao meu grupo de oração Água Viva, Renata, Thiago, Otávio, Jullyana, Lucas, Gabriela, Neusa, Tia Glorinha, aqueles quem são mais que um marco na minha história, mas sim a minha própria história
A ‘Mesquitaiaada’ que me ensinou que ser família não é morar na mesma casa ou ter o mesmo sangue, mas sim morar no mesmo coração
Aos maiores tesouros que eu encontrei nessa vida, Tanda, Bebê, Él, Nena, Nina, Junior, Quequel”*

AGRADECIMENTOS

Obrigado Deus por me abençoar com a oportunidade de ter me permitido viver essa experiência que me levou a um crescimento extraordinário, tanto do ponto de vista acadêmico quanto do ponto de vista humano.

Inicialmente o que me levou a ingressar no programa foi o sonho de me tornar mestre, mas certamente o que me motivou ainda mais a chegar até aqui, foi um sonho muito maior... O de orgulhar aqueles que acreditaram em mim e me acolheram no meio deles como se fosse eu um deles, meus orientadores Aline Sueli de Lima Rodrigues, Guilherme Malafaia Pinto. Obrigado por tudo! Por terem acreditado em mim, e me instigado a sempre dar o meu melhor! Eu tenho orgulho em ser orientando de vocês.

A minha família, embora eles não sejam a mais perfeita, e cheia de problemas, sei que se eu pudesse escolher outra família, eu não seria capaz de escolher tão bem quanto Deus escolheu por mim, uma família para chamar de minha.

Ao Colégio Sagrado Coração de Jesus, minha eterna casa, e meu eterno carinho... A cada um dos meus professores que de fato marcaram a minha formação. É “SAGRADO” o amor que eu tenho por vocês

A toda equipe do laboratório de Pesquisas Biológicas, quem me ensinaram um universo de conhecimento que eu sequer imaginava existir.

A primeira turma do PPG CRENAC, que me acolheram como “aluno especial” e acabaram por se tornarem especiais demais no meu coração, e torceram por mim, e não me deixaram sequer cogitar a desistência desse sonho.

A todos os meus colegas de turma, que foram imprescindíveis para que hoje eu pudesse estar aqui.

Ao IFGoiano campus Urutaí por ter novamente me aberto as portas para a volta a vida acadêmica, e a cada funcionário responsável pelo funcionamento desta instituição.

A Rafaela Lobo, pelo companheirismo, pelo carinho, por ter aturado tantos surtos, tantos desabafos e me revelar que existem pessoas que carregam no jeito de ser o dom de tornar qualquer lugar uma das 8 maravilhas do mundo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IX
RESUMO	13
<u>ABSTRACT</u>	<u>14</u>
<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>15</u>
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>16</u>
2.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
2.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE EFLUENTE DE CURTUME	17
2.3. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DE CURTUME.....	18
2.4. BIOMARCADORES.....	18
2.4.1. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	19
2.4.1.1. CAPACIDADE LOCOMOTORA	19
2.4.1.2. TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	19
2.4.1.3. TESTE DE COMPORTAMENTO PREDATÓRIO (CODORNAS ENQUANTO PREDADORES)	20
2.4.1.4. TESTE DE RESPOSTA DEFENSIVA ANTIPREDATÓRIA (CODORNAS ENQUANTO PRESAS)	22
.....	22
2.4.2. MUTAGENICIDADE	23
2.4.3. PARÂMETROS LIGADOS À REPRODUÇÃO	24
2.4.4. OUTROS PARÂMETROS	25

2.4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
<u>3. RESULTADOS</u>	<u>26</u>
<u>4. CONCLUSÕES</u>	<u>46</u>
<u>5. AGRADECIMENTOS.....</u>	<u>47</u>
<u>6. REFERÊNCIAS.....</u>	<u>47</u>

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

- Figura 1-** Desenho esquemático (em 3D) dos aparatos utilizados no (A) teste do campo aberto e (B) de reconhecimento de objetos. As cores são meramente ilustrativas.....**17**
- Figura 2-** Desenho esquemático (em 3D) dos aparatos utilizados no (A) teste do campo aberto e (B) de reconhecimento de objetos. As cores são meramente ilustrativas.....**21**
- Figura 3.** (A) Biomassa corpórea inicial e final e (B) biomassa relativa do fígado e cérebro de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume.**25**
- Figura 4.** (A) Latência para o primeiro movimento; (B) total de cruzamentos dos quadrantes traçados no assoalho do campo aberto e (C) tempo e frequência de exibição do comportamento de freezing por *Coturnix coturnix japonica* expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume..**27**
- Figura 5.**(A) Tempo e (B) frequência de exibição do comportamento de congelamento, (C) frequência de exibição do comportamento de high-posture e (D) e de ground scratching de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.....**30**
- Figura 6.** (A) Tempo (s) e (B) frequência de exploração das lâminas contento ou não as larvas (verdadeiras e falsas), (C) latência para comer as larvas verdadeiras e (D) índice de predação de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume.....**33**
- Figura 7.** (A) **Figura 7.** (A) Total de cruzamentos dos quadrantes traçados no assoalho do aparato e tempo de permanência nas zonas (A) aversiva e de (B) segurança, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.....**36**
- Figura 8.** (A) Total de anormalidades nucleares eritrocitárias, (B) de núcleos assimétricos, simétricos e deslocados, (C) eritrócitos binucleados, micronucleados e indented nucleus e (D) anuclear erythrocytes de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.**40**

Figure 9. Fotomicrografias que representam as anormalidades nucleares mais frequentemente observadas em codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.	42
Figura 10. (A) Biomassa fresca e (B) espessura da casca de ovos, (C) taxa de conversão alimentar e (D) eficiência alimentar de codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.....	45
Figura 11. (A) Escores de coloração dos ovos produzidos relacionados ao padrão de manchas (A) e cor de fundo das cascas dos ovos produzidos por codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.....	48
Tabela 1S. Resultados da análise química e microbiológica da água, do efluente de curtume e de suas respectivas diluições (concentrações).....	60
Table 2S. General information from the organic compound analysis of the 100% tannery effluent.	61
Tabela 3S. Síntese dos resultados obtidos no presente estudo, com identificação de aumento (↑), diminuição (↓) ou nenhuma alteração (-) nos parâmetros avaliados em codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume...	62
Tabela 3S. Continuação.....	63
Figura 1S. Vazão média anual do curso d'água situado próximo à empresa de curtume concedente do efluente utilizado no presente estudo.....	65
Figure 2S. (A) Mass spectrum of raw tannery effluent by Electrospray Ionization (+) Orbitrap MS and (B) Electrospray Ionization (-) Orbitrap MS.....	66
Figura 3S. (A) Desenho esquemático representativo do modelo RGB de cores; (B-C) variação da tonalidade das cores de fundo dos ovos; (D) variação da quantidade de manchas e tonalidade da casca dos ovos. A variação de cores foi categorizada a partir do software ColorPix v.1.1.....	69
Figura 4S. (A) Área superficial, (B) volume; (C) índice de forma e (S) percentual de casca dos ovos produzidos de codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume.	70

INGESTÃO DE EFLUENTE DE CURTUME COMO UM FATOR DE RISCO À SAÚDE DAS AVES: UM ESTUDO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO *Coturnix coturnix japonica* COMO SISTEMA MODELO

RESUMO

As indústrias curtumeiras geram grandes quantidades de efluentes de curtume (TE), os quais têm sido considerados altamente tóxico à diversos grupos de animais. No entanto, a identificação e caracterização do impacto desse poluente sobre as aves ainda é muito incipiente. Assim, nosso objetivo foi avaliar as possíveis alterações biológicas de *C. coturnix japonica* expostas por 45 dias a diferentes diluições de TE (1.4%, 3.1% and 6.5%), utilizando biomarcadores comportamentais, mutagênicos e de produção de ovos. Quando submetidas aos testes comportamentais, as codornas que ingeriram TE apresentaram comportamento compatível com efeito ansiolítico no campo aberto; ausência de reatividade emocional no teste de reconhecimento de objetos; reduzido índice de predação de larvas de *Tenebrio molitor* (potenciais presas); bem como déficit de resposta defensiva antipredatória quando confrontadas especialmente com macho de *Felis catus* (potencial predador). Além disso, observamos nessas aves aumento da biomassa relativa do fígado, maior índice de conversão alimentar e menor índice de eficiência alimentar; efeito mutagênico do TE (inferido pelo aumento de anormalidades nucleares eritrocitárias); menor desempenho produtivo e produção de ovos de biomassa e espessura da casca reduzidas, além de padrão de coloração diferente dos ovos produzidos pelas codornas do grupo controle. Portanto, nosso estudo confirma a toxicidade do TE em *C. coturnix japonica*, mesmo em pequenas diluições. Enquanto as alterações comportamentais demonstram o potencial neurotóxico do poluente, as demais alterações sugerem os mecanismos de ação de seus constituintes químicos não são seletivos, isto é, agem sistemicamente, atuando sinérgica, antagônica ou aditivamente, causando efeitos prejudiciais aos animais.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, Ecotoxicologia, Aves, Poluição aquática; Codornas japonesas.

INGESTION OF TANNERY EFFLUENT AS A RISK FACTOR TO BIRD HEALTH: A TOXICOLOGICAL STUDY USING *Coturnix coturnix japonica* AS A MODEL SYSTEM

ABSTRACT

The tannery industries generate a large amounts of tannery effluents (TE), which have been considered highly toxic to various animal groups. However, the identification and characterization of the impact of this pollutant on birds is still very incipient. Thus, our objective was to evaluate the possible biological changes of *C. coturnix japonica* exposed for 45 days at different TE dilutions (1.4%, 3.1% and 6.5%) using behavioral, mutagenic and egg production biomarkers. When submitted to the behavioral tests, the quails that ingested TE presented behavior compatible with anxiolytic effect in the open field; absence of emotional reactivity in the object recognition test; reduced rate of predation of *Tenebrio molitor* larvae (potential prey); as well as ant predictive defensive response deficit when confronted especially with *Felis catus* male (predatory potential). In addition, we observed in these birds increased relative biomass of the liver, higher feed conversion index and lower feed efficiency index; mutagenic effect of ET (inferred by increased erythrocyte nuclear abnormalities); lower production performance and biomass egg production and reduced shell thickness, as well as a different staining pattern of the eggs produced by the quail of the control group. Therefore, our study confirms the toxicity of ET in *C. coturnix japonica*, even in small dilutions. While the behavioral changes demonstrate the neurotoxic potential of the pollutant, the other alterations suggest the mechanisms of action of its chemical constituents are not selective, that is, they act systemically, acting synergistically, antagonistically or additionally, causing detrimental effects to the animals.

Keywords: Agroindustry wastes, Ecotoxicology, Birds, Aquatic pollution; Japanese quail

1. INTRODUÇÃO

A indústria curtumeira é responsável por parte significativa da economia de diferentes países – especialmente aqueles asiáticos e da América do Sul (Aber et al., 2010) –, gerando emprego e matéria prima para setores ligados à produção de calçados, bolsas, vestuários e estofamentos (Marques et al., 2017). Por outro lado, os processos necessários para a transformação da pele *in natura* em couro geram enormes quantidades de resíduos que podem impactar o ambiente e a biota, se descartados incorretamente (Mwinyihija, 2010; Mwinyihija, 2012). Estudos prévios já demonstraram que os tannery effluent (TE) são compostos por uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos com alto potencial poluidor (Kumar et al., 2008; Guimarães et al., 2016; Montalvão et al., 2018).

Mais recentemente tem sido demonstrado que a exposição a TE causa alterações biológicas importantes em distintos modelos experimentais do grupo dos metazoários (Souza et al., 2016a). Alterações bioquímicas, na resposta imune e genotóxicas, por exemplo, já foram observadas em peixes expostos ao poluente (Weldetinsae et al., 2017; Borgia et al., 2018; Lunardelli et al., 2018). Além disso, girinos expostos ao TE apresentaram prejuízos no desenvolvimento, alterações comportamentais e alterações nucleares eritrocitárias (Montalvão et al., 2018; Amaral et al., 2018) e, em camundongos, estudos prévios já relataram distúrbios comportamentais, alterações histopatológicas e reprodutivas (Kumar et al., 2008; Siqueira et al., 2011; Guimarães et al., 2017; Souza et al., 2017a; Estrela et al., 2017; Guimarães et al., 2018; Rabelo et al., 2018’).

Contudo, em relação ao grupo das aves, poucos estudos avaliaram os efeitos da exposição desses animais aos TE. Até onde vai nosso conhecimento, apenas dois estudos abordaram essa problemática. Hoffman & Eastin (1981) expuseram ovos de *Anas platyrhynchos* à solventes orgânicos e a diferentes efluentes industriais (incluindo os TE) por um curto período de tempo. Na ocasião, a exposição dos ovos simulou a transferência de poluentes das penas de aves aquáticas para os seus ovos, causando redução no crescimento embrionário das aves. Mais recentemente demonstramos que a exposição de *Melopsittacus undulates* (periquitos australianos) a ingestão de água contendo TE causou efeito mutagênico, indicado pela elevada formação de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares em eritrócitos circulantes (Souza et al., 2017b). Portanto, nota-se que o conhecimento sobre os impactos da poluição aquática causada pelos TE sobre as aves é muito limitado.

Conforme relatado por Sekercioğlu et al. (2004), aproximadamente 20% das espécies de aves estão sob o risco de extinção e 6,5% já se encontram funcionalmente extintas. Os estudos revistos por esses autores demonstram ainda que pelo menos ¼ das espécies frugívoras e onívoras e aproximadamente 1/3 das aves herbívoras, piscívoras e exóticas são propensas à extinção, sendo que a poluição aquática tem sido uma das responsáveis por esse cenário (Hallmann et al., 2014; Behrouzi-

Rad & Behrouzi-Rad, 2014). Portanto, estudos que avaliem como os poluentes aquáticos impactam as populações aviárias podem contribuir para a proposição de estratégias ou ações de mitigação de impactos, com consequências positivas na conservação ou preservação desses animais.

Nesse sentido, a avaliação da resposta comportamental, dos efeitos mutagênicos e de possíveis mudanças biométricas, constituem biomarcadores importantes que podem predizer como os poluentes aquáticos (incluindo os TE) podem impactar o *fitness* dos indivíduos e, conseqüentemente, a estruturação e organização das populações aviárias. Conforme ressaltado por Amaral et al. (2018), quanto maior for as variáveis biológicas investigadas em estudos (eco)toxicológicos, maior será nosso *know-how* para compreendermos a magnitude dos impactos causados pelos poluentes nos ambientes naturais. O grupo das aves, por exemplo, ao serem expostas a poluentes (dieta ou indiretamente) podem apresentar distúrbios comportamentais com consequências drásticas; porém, pouco conhecidas.

Considerando esse cenário, utilizamos indivíduos da espécie *Coturnix coturnix japonica* para ampliarmos o conhecimento sobre as consequências da exposição crônica a concentrações ambientais preditivas relevantes de TE. Tal espécie tem sido considerada um excelente modelo animal para estudos (eco)toxicológicos, já que apresentam fácil manuseio em cativeiro, boa resistência a doenças e baixo custo de manutenção (Romijn, 1995; Mineau, 2005; Michael & Quinn-Jr, 2012, De-Faria et al., 2018). Por outro lado, embora não esteja ameaçada de extinção [pela Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2016)], suas populações naturais tem sofrido crescente declínio (Okuyama, 2004) e, portanto, estudos como o nosso podem contribuir (direta ou indiretamente) para a conservação da espécie, especialmente em países asiáticos onde a densidade populacional desses indivíduos e as atividades curtumeiras são elevadas.

Assim, nosso objetivo foi avaliar as possíveis alterações biológicas de *C. coturnix japonica* expostas cronicamente a distintas concentrações TE, consideradas concentrações ambientais relevantes. Partimos da hipótese de que a ingestão de água contendo esse poluente pode causar déficit de locomoção, da percepção do ambiente e da resposta defensiva antipredatória frente a potenciais predadores naturais (cobra e gato). Além disso, partimos do pressuposto de que baixas concentrações de TE seriam suficientes para causarem efeitos mutagênicos, assim como alterações que podem interferir indireta e negativamente na reprodução desses animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

Neste estudo utilizamos 48 fêmeas de codornas japonesas (*C. coturnix japonica*) (35-45 dias) adquiridas em criadouro comercial (Pires do Rio, GO, Brasil) e mantidas em ambiente de temperatura

(24 a 25° C) e luminosidade (12h claro/12 h escuro) controlada do setor aviário do Biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas (Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, GO, Brasil). No biotério, os animais foram mantidos em gaiolas de aço na densidade populacional de 255 cm²/bird, como também adotado por De-Faria et al. (2018). Antes do início do experimento os animais foram aclimatados às condições laboratoriais por 15 dias. Em seguida, as codornas foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n=12 codornas/grupo) com biomassa corpórea equitativa entre os grupos. Às codornas do grupo controle (C) foi oferecida água potável sem TE (em bebedouros convencionais) e àquelas dos grupos TE(1,4), TE(3,1) e TE(6,5) foi oferecido água contendo 1,4%, 3,1% e 6,5% de TE, o qual foi cedido por uma empresa curtumeira (Inhumas, GO, Brasil). A ração [segundo as recomendações da NRC (1994)] e às águas (com ou sem TE) foram ofertados *ad libitum*, sendo que os animais foram expostos por um período de 45 dias consecutivos.

2.2. Determinação das concentrações de efluente de curtume

Para a definição das diluições de TE nas águas ofertadas aos animais, consideramos o regime de funcionamento e quantidade de peles processadas diariamente na empresa concedente do efluente, bem como o registro histórico anual da vazão mensal do curso d'água mais próximo à empresa, o qual serve ilegalmente como corpo receptor destes efluentes. Para a determinação da taxa de geração de efluentes, consideramos uma jornada de trabalho diário de 8h, o processamento médio de 1 tonelada de pele ao dia (dados fornecidos pela empresa) e que esse quantitativo gera em média 32 m³ de efluentes, segundo Pacheco (2005). Nesse sentido, a vazão de efluentes considerada para a definição das diluições avaliadas em nosso estudo foi de 4 m³/h.

O curso d'água situado próximo à empresa apresentou no ano anterior à realização deste estudo (2017) a vazão média mensal apresentada na Figura 1S (vide "Material Suplementar"). Em razão de não haver a intenção de atuar como agentes fiscalizadores do cumprimento de legislações ambientais no território brasileiro ou como fonte de informação que possam subsidiar denúncias aos órgãos ambientais competentes, optamos pela omissão dos nomes da empresa concedente do TE e do curso d'água referido que margeia o curtume. A partir da constatação de que a vazão de um curso d'água pode variar ao longo do ano, correlacionando-se diretamente com o regime pluviométrico da região, decidimos avaliar diferentes diluições de TE, plausíveis de serem encontradas na estação chuvosa (quando a vazão dos rios aumenta consideravelmente na região de estudo) e na estação seca (quando a vazão reduz substancialmente). Além disso, definiu-se uma concentração de TE correspondente à vazão mediana anual do curso d'água.

Para o cálculo da taxa de diluição do TE, foi utilizada a equação da diluição do TE no corpo receptor, presente na Resolução n. 430 de 2011 do Conselho Nacional de Meio Ambiente

(CONAMA, Brasil), expressa pela fórmula: $CECR = (Q_e / (Q_e + Q_r))$, onde “CECR” refere-se à concentração do efluente no corpo receptor (taxa de diluição); “ Q_e ” à vazão de efluentes e “ Q_r ” à vazão do curso d’água. Considerando a vazão constante de TE ao longo de todo ano ($4 \text{ m}^3/\text{h}$), assim como a média da vazão do curso d’água nos meses mais chuvosos (dezembro, janeiro, fevereiro e março) ($274,37 \text{ m}^3/\text{h}$) e nos meses mais secos (julho, agosto, setembro e outubro) ($57,51 \text{ m}^3/\text{h}$), chegou-se às diluições de 0,014 (ou 1,4%) e 0,065 (ou 6,5%), respectivamente. Já a concentração de efluente de 0,031 (ou 3,1%) foi obtida, a partir da mediana das vazões mensais registradas ao longo de todo ano ($121,1 \text{ m}^3/\text{h}$).

2.3. Caracterização do efluente de curtume

A caracterização química e físico-química do TE foi realizada conforme procedimentos metodológicos preconizados pela American Public Health Association (APHA, 1997). A análise microbiológica para detecção de coliformes totais na água e no TE foi realizada conforme procedimentos descritos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (Brasil, 2006). Já a análise de compostos orgânicos foi realizada via espectrometria de massas com ionização por eletrospray. A fonte do eletrospray foi operada no modo positivo e negativo. Utilizou-se nitrogênio altamente puro (>98%) como dessolvatação ($200 \text{ }^\circ\text{C}$; $4 \text{ L}/\text{min}$) nebulizador e gás de colisão. A pressão do nebulizador foi mantida a 0,4 bar e a voltagem da capilaridade fixada em 4500V. As condições do Q-TOF foram as seguintes: Deslocamento da placa terminal: -500 V; Funil 1: 200 Vpp; Funil 2: 200 Vpp; Hexapolo RF: 200 Vpp; Colisão RF: 400 Vpp; Tempo de Transferência: $70 \mu\text{s}$; Armazenamento pré-pulso: $5 \mu\text{s}$; Quadrupolo de Energia Iônica: 5eV; Média de rolagem: $2 \times 1\text{Hz}$. Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando um Software de Análise de Dados Bruker Compass (Bruker Daltonik, GmbH).

2.4. Biomarcadores

A avaliação da toxicidade do TE foi realizada a partir de biomarcadores comportamentais, mutagênicos, biométricos e reprodutivos, conforme detalhados a seguir. Na análise comportamental investigamos o potencial dos TE causarem alterações locomotoras, déficit na percepção do ambiente, alterações no comportamento alimentar e prejuízo na resposta defensiva contra potenciais predadores. Para isso, os animais foram submetidos à diferentes testes comportamentais, os quais foram realizados em sala de teste que continha isolamento acústico, controle de luminosidade/temperatura, além de câmeras que se conectavam com computador localizado externamente.

2.4.1. Análises comportamentais

2.4.1.1. Capacidade locomotora

Os efeitos dos tratamentos sobre a capacidade locomotora das codornas foram avaliados por meio do teste do campo aberto (no 40º dia experimental), conforme procedimentos adotados por De-Faria et al. (2018). Tal teste foi realizado em aparato com dimensões de 58 cm largura x 38 cm altura x 40 cm comprimento, cujas paredes eram opacas, impedindo que o animal visualizasse o ambiente externo. Após serem colocados individualmente no centro do aparato (Figura 1A), o animal era filmado por 5 min ininterruptos. Entre um animal e outro, o aparato era higienizado com álcool a 70%. Em seguida, a latência para a primeira locomoção e o total de cruzamentos dos quadrantes (10,5 cm²) traçados no assoalho do aparato foram registrados, utilizando-se o PlusMZ software.

2.4.1.2. Teste de reconhecimento de objetos

Para avaliação da capacidade de percepção do ambiente e possível reação à novidade, as codornas foram submetidas ao teste de reconhecimento de objetos (no 41º dia experimental), de acordo com De-Faria et al. (2018). Este teste é realizado em duas sessões. Na primeira, simulamos a introdução de um objeto no interior da gaiola (i.e.: a mão do pesquisador era introduzida na gaiola) onde a codorna (individualmente) se encontrava e na sequência o animal foi filmado por 5 min. Posteriormente, o mesmo procedimento era adotado; porém, um objeto era colocado no assoalho da gaiola e a codorna era filmada por mais 5 min (Figura 1B). Tal objeto consistiu de um cilindro de polypropyleno fixado a uma base (10 cm de altura e 1 cm de diâmetro) que continha faixas intercaladas nas cores azul, vermelho, amarelo, cinza e verde, já que as aves são mais sensíveis à percepção de cores de acromaticidade oposta (Salven et al., 1971).

Pressupomos que esse objeto despertaria atenção das aves, permitindo-nos avaliar mais precisamente sua habilidade perceptiva. Entre um animal e outro a gaiola era higienizada com álcool a 70%. Finalizadas as filmagens, os seguintes parâmetros foram registrados: frequência (f_{con}) e tempo (t_{con}) de congelamento (para cálculo do índice de congelamento (I_{con}), dado pela fórmula “ $f_{con}/t_{con} \times 100$ ”; frequência (f_{cis}) e tempo (t_{cis}) de exibição do comportamento de ciscar seguido ou não do comportamento de “banho na areia” (para cálculo do índice de ciscagem (I_{cis}) dado pela equação “ $f_{con}/t_{con} \times 100$ ”), bem como a frequência de levantamentos. O comportamento de ciscar foi registrado sempre que a ave explorava sua área com seus pés e bicos direcionados para o assoalho da gaiola. Em alguns momentos essa categoria comportamental era acompanhada de tentativas da codorna de revolver o assoalho. Já o levantamento era registrado quando a ave ficava com o corpo ereto com visível intenção de explorar o ambiente ao seu redor e o congelamento era registrado sempre que a

ave permanecia imóvel – normalmente com olhar fixo em alguma direção – ou quando realizada pequenos movimentos respiratórios.

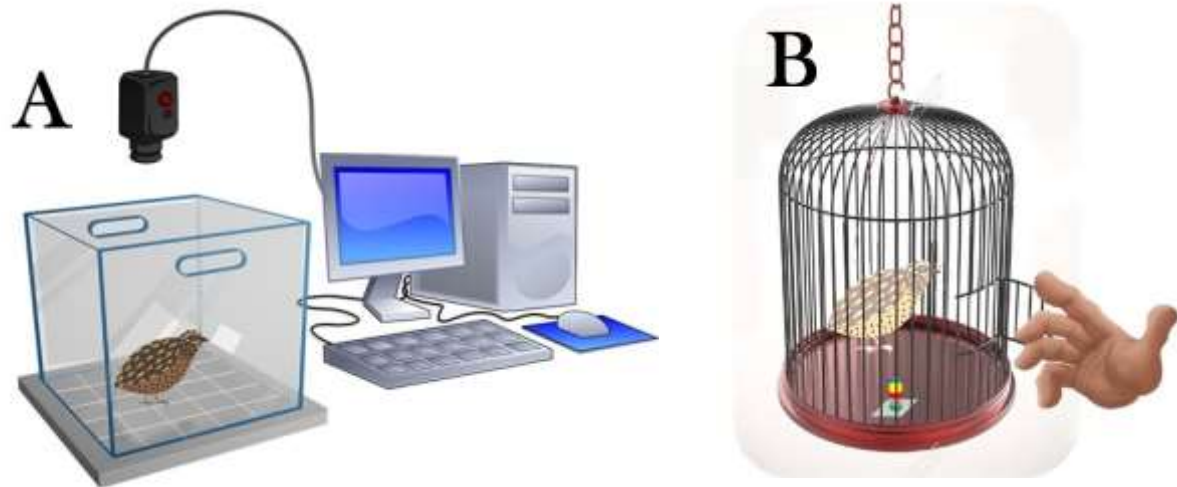


Figura 1. Desenho esquemático (em 3D) dos aparatos utilizados no (A) teste do campo aberto e (B) de reconhecimento de objetos. As cores são meramente ilustrativas.

2.4.1.3. Teste de comportamento predatório (codornas enquanto predadores)

Neste teste (realizado no 42º dia experimental) avaliamos se a exposição ao TE poderia suprimir ou alterar o comportamento predatório inato das codornas. Para isso, foi utilizado um aparato retangular (de paredes opacas) nas seguintes dimensões: 60 cm de comprimento x 40 cm de largura x 40 cm de altura. Em uma das extremidades do aparato havia uma abertura estreita (15 cm de comprimento x 2 cm de altura) por onde eram oferecidos às codornas os diferentes estímulos alimentares (Figura 2A).

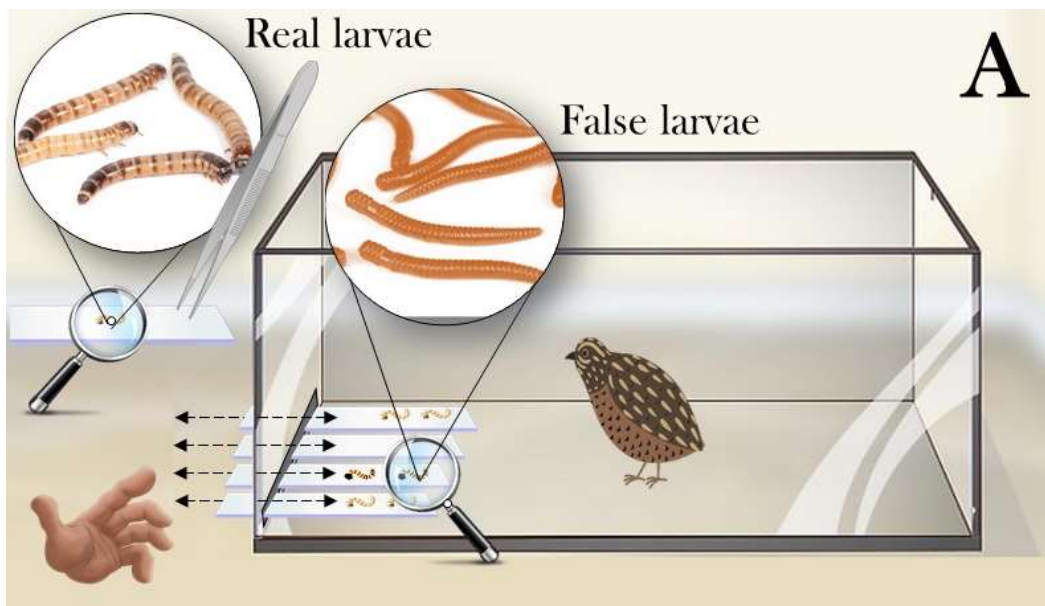
Objetivando descartar a hipótese de que as codornas pudessem explorar ou atacar qualquer objeto estranho e, não necessariamente, exibir um comportamento de predação, oferecemos aos animais dois tipos de estímulos: (i) falsa larva de inseto (silicone, não tóxicas e sem odores, obtidas no www.amazon.com) e (ii) uma larva real. Como representante desta última, utilizamos larvas de 2º estágio ($\pm 1,5$ cm) de besouros da espécie *Tenebrio molitor*.

A dinâmica do teste iniciava com a fixação de duas larvas (falsas ou reais) por lâmina de plástico polietileno (16 cm de comprimento x 3 cm de largura). As larvas em cada lâmina eram posicionadas de modo que a primeira e segunda larvas ficavam a 2 cm e 3,5 cm de distância de uma das extremidades da lâmina. Após o preparo das lâminas, a codorna teste (privada de alimentação por 5 h anteriores ao teste) era introduzida no aparato e filmada por 3 min, sem a presença de qualquer estímulo alimentar. Em seguida, 4 lâminas (contendo larvas falsas, reais ou sem larvas) eram oferecidas em ordem sequencial pré-definida (permanecendo 40 s/lâmina no aparato) que alternava entre um animal e outro de cada grupo experimental (**sequência A:** real larvae de *T. molitor* > larva

falsa > nada > larva real; **sequência B**: larva falsa > larva real > nada > larva real). Nosso intuito foi excluir potencial previsibilidade das codornas relativa à ordem sequencial com que as larvas eram introduzidas no aparato. Além disso, a introdução de lâminas sem qualquer larva foi importante para descartarmos a hipótese de que as codornas seriam atraídas pela lâmina de plástico, em si. Essa dinâmica foi realizada duas vezes para cada ave, para assegurar que a exploração das larvas pelas codornas não seria aleatória, assim como para inferir sobre a aquisição de memória alimentar e ferocidade predatória das aves.

Após as filmagens, registramos o tempo de exploração e a frequência de bicagem em cada lâmina, a latência para comer as larvas verdadeiras na primeira e segunda exposições, bem como o índice de predação. O índice de predação (IP) foi calculado pela Eq. 1, onde “NA” e “Ttotal” referem-se ao número de animais que comeram as larvas verdadeiras e tempo total do teste, respectivamente. Entre um animal e outro o aparato era higienizado com álcool a 70%.

$$IP = (NA/Ttotal) \times 1000 \quad (1)$$



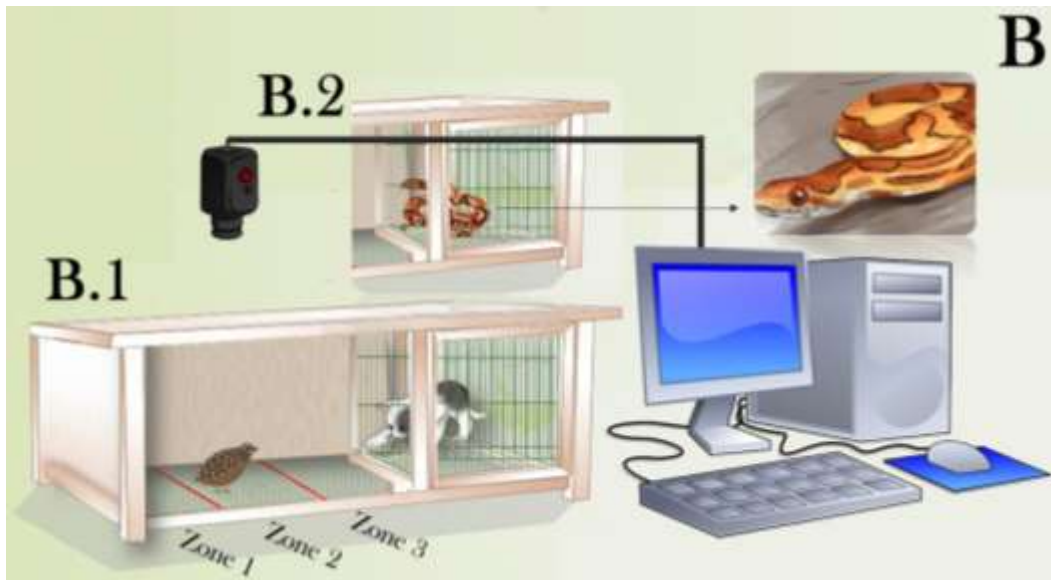


Figura 2. Desenho esquemático (em 3D) dos aparatos utilizados no (A) teste de comportamento predatório e (B) de resposta defensiva antipredatória, em que codornas japonesas (*Coturnix japonica*) expostas ou não a efluente de curtume foram submetidas. As cores são meramente ilustrativas.

2.4.1.4. Teste de resposta defensiva antipredatória (codornas enquanto presas)

A resposta defensiva antipredatória foi avaliada utilizando um aparato em que as codornas eram colocadas em contato com dois potenciais predadores (cobra e gato) em sessões e dias diferentes. Em ambos os testes, utilizamos um aparato nas dimensões de 150 cm comprimento x 30 cm largura x 30 cm altura, de paredes opacas e com assoalho dividido em três distintas zonas (50 cm de comprimento/cada) (Figura 2B). Tais zonas foram discriminadas (zona 1, 2 e 3) pela distância em que se localizavam do recinto onde os predadores eram introduzidos. A zona 3 se localizava mais próximo do recinto do predador e, portanto, foi denominada de “zona aversiva”, já que pressupúnhamos que as codornas seriam aversas ao gato e/ou cobra e que ir ou permanecer nessa zona implicaria em risco iminente. Por outro lado, a zona 1 foi denominada de “zona de segurança”, já que era a mais distante do recinto dos predadores e, caracterizava a localização espacial que representaria menor risco de predação. Já a zona 2, correspondia uma região neutra, a qual representava a transição entre a ‘zona aversiva’ e de “segurança”. Destaca-se que o recinto onde o predador era introduzido apresentava 60 cm comprimento x 40 cm largura x 40 cm altura. As paredes do recinto também eram opacas, com exceção daquela frontal (Figura 2B). Nesse caso, a codorna teste recebia estímulos visuais, olfatórios e auditivos de seus potenciais predadores, porém a tela que os separavam garantia que ataques imprevistos não ocorressem.

O predador felino utilizado foi um gato macho saudável da espécie *Felis silvestris catus*, o qual apresentava padrão de pelagem brown agouti. Esse animal foi capturado em ambiente urbano e

mantido em recinto apropriado no setor clínico do Departamento de Medicina Veterinária do IF Goiano – Campus Urutaí (GO, Brasil), privado de alimentos por 9 horas – para estimular seus extintos predatórios. Já o predador ofídico foi um macho da espécie *Pantherophis guttatus* (4 anos de idade) que apresentava padrão de coloração do tipo *Okeetee* – normal ou comum. A cobra era alimentada rotineiramente com camundongos, mas no dia do teste faziam 20 dias que ela não recebia qualquer tipo de alimento.

A exposição das codornas ao predador felino (Figure 2B.1) e ofídico (Figure 2B.2) ocorreu no 43° e 45° dia experimental, respectivamente, isto é, intercalados por um período de 24 h. Em ambos os dias experimentais, o teste iniciava com a introdução da codorna (sempre individualmente) no centro do aparato (zona neutra) com o cabeça voltada para uma das paredes laterais. Em seguida, a ave explorava o aparato por 10 min; porém, na ausência de predadores no recinto. Essa sessão era denominada de “fase de habituação”. Na sequência, a codorna era retirada do aparato e colocada de volta à sua gaiola residência. Quando todas as codornas (de todos os grupos) passavam pela fase de habituação, a segunda sessão do teste era iniciada. Nessa sessão, os procedimentos anteriores eram repetidos; porém, a codorna teste explorava o aparato (também por 10 min) na presença dos seus potenciais predadores. Após as filmagens registramos o total de cruzamentos entre as zonas traçadas no assoalho do aparato e o tempo (s) de permanência nas zonas “aversiva” e de “segurança”.

2.4.2. Mutagenicidade

A mutagenicidade do TE foi avaliada por meio do ensaio do micronúcleo (MN), foi realizado em eritrócitos circulantes periféricos maduros com base no procedimento descrito anteriormente por Souza et al. (2017). A frequência de anormalidade nuclear foi determinada no final da fase de exposição. Aproximadamente 20 µL de sangue/codorna foram coletados via decapitação e, posteriormente, esfregaços de sangue foram preparados para avaliar o possível efeito mutagênico resultante da exposição desses animais a água contendo TE. Duas lâminas foram preparadas para cada animal. fixadas em metanol frio a 100% (v / v) por 5 min e coradas com Panótico Rápido® (New Prov). Em seguida, todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com lente de imersão, com base nos procedimentos metodológicos adotados por Montalvão et al. (2017). Dois mil (2.000) eritrócitos circulantes de cada indivíduo foram contados. Apenas os eritrócitos que não se sobrepuseram e apresentaram membranas celulares e nucleares intactas foram levados em consideração. As lâminas foram analisadas às cegas e aleatoriamente. A investigação também verificou se o TE induziria a formação de outras anormalidades nucleares eritrocitárias. Esta investigação quantificou as anomalias nucleares observadas nas lâminas avaliadas.

2.4.3. Parâmetros ligados à reprodução

A avaliação dos possíveis efeitos do TE sobre aspectos reprodutivos, foi realizada a partir do registro do número total de ovos postos por gaiola durante o dia pelo número médio de aves. Os parâmetros de qualidade dos ovos foram: (a) área da superfície; (b) índice de forma do ovo; (c) percentual e (d) espessura da casca; (e) biomassa dos ovos e (f) características visuais dos ovos.

A área da superfície (A_s) (em cm^2) e o volume (cm^3) de cada ovo foram estimados a partir das equações matemáticas propostas por Narushim (2005) (Eq. 2 e 3), onde “L” e “C” referem-se à largura e comprimento máximos de cada ovo.

$$V = 0,525 \times C \times L^2 \quad (2)$$

$$A_s = \left(0,9658 \times \frac{L}{C} + 2,1378\right) \times C \times L \quad (3)$$

O comprimento do ovo (ao longo do eixo longitudinal) e a largura do ovo (ao longo do eixo equatorial) foram medidos com um medidor digital (precisão de 0,01). O índice de forma de ovo foi calculado como a razão entre largura e comprimento do ovo (%) pelo método proposto por Anderson et al. (2004).

As cascas dos ovos foram lavadas e secas em estufa por dois dias a 60°C para posterior cálculo do percentual de casca (em relação à biomassa fresca dos ovos) e sua espessura, conforme procedimentos adaptados de Kamata et al. (2006). Nesse último caso, as medições (com paquímetro digital) ocorreram em três pontos distintos ao longo do meridiano dos ovos: (a) ponta superior (a), (b), o eixo equador (c) ponta inferior. Já a biomassa dos ovos no período experimental foi obtida multiplicando-se o peso médio dos ovos pelo número total de ovos produzidos no período experimental, conforme Lima et al. (2015). Esta massa total foi dividida pelo número total de aves por dia do período, sendo expressa em gramas de ovo/codorna/dia.

As características visuais dos ovos das codornas também foram avaliadas [similarmente à Collias (1993), Westmoreland & Kiltie (1996) e Kirikci et al. (2005)], uma vez que esse parâmetro pode ser alterado em condições de poluição (Jagannath et al., 2008. Wilson, 2017). A coloração de fundo e o padrão de manchas dos ovos foram avaliadas com base em Farghly et al. (2015) e Idahor et al. (2015). Para a categorização das cores do fundo dos ovos adotamos o sistema RGB, isto é, sistema de cores aditivas em que o vermelho, o verde e o azul são combinados de várias formas de modo a reproduzir um largo espectro cromático (Figura 3S-A). Nesse sistema, as cores são obtidas através das misturas das três cores primárias, em quantidades determinadas. Cada cor está enquadrada numa escala que varia de 0 a 255. Quando a mistura das três cores está no valor mínimo (0, 0, 0), o resultado é a cor preta. Quando está no máximo (255, 255, 255), a cor resultante é a branca. Após

uma avaliação geral de todos os ovos produzidos, identificamos uma variação de quatro cores de fundo dos ovos, conforme apresentado na Figura 3S-B, sendo o valor RGB obtido por meio do software ColorPix v.1.1. Tais cores foram categorizadas em “esbranquiçada”, “esverdeada”, “azulada” e “amarronzada” e aplicando o sistema RGB, as quais formam um gradiente de tonalidade (da mais clara para a mais escura) (Figura 3S-C). Já as manchas castanho-escuras ou negras salpicadas nas cascas foram categorizadas com base na quantidade identificada na casca, isto é, em “pequena” (escore 10), “média” (escore 50) ou “grande” (escore 100), as quais também formam um grande de tonalidade conforme Sezer & Tekelioglu (2009), com modificações (Figura 3S-D). Logo, tem-se ovos mais claros e mais escuros, com cores de fundo que também variam da mais clara para a mais escura.

2.4.4. Outros parâmetros

Ao longo do experimento foram medidos o consumo de água e ração. O consumo diário foi calculado através da subtração do restante ao total de água e comida ofertado por de acordo com Estrela et al. (2015). A taxa de conversão alimentar foi calculada em gramas de ração por gramas de ovo produzido, de acordo com Manafi (2018). Já a eficiência alimentar foi calculada conforme El-Hack et al. (2017) e expressa como g ovo/g ração

2.4.5. Análises estatísticas

Inicialmente a normalidade de todos os dados obtidos foi testada utilizando-se os testes Shapiro-Wilk, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov. Os testes de Levene e Bartlett avaliam a igualdade de variância residual. Os dados relativos ao campo aberto, à qualidade dos ovos e à avaliação da mutagenicidade do efluente de curtume foram comparados através da ANOVA one-way (dados paramétricos) e através do teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos), também a 5% de probabilidade. Por outro lado, dados de biomassa corporal, comportamento predatório e dados de reconhecimento de objetos e respostas a testes de predadores, foram analisados como teste paramétrico, pois as aves na primeira e segunda sessões foram as mesmas. Nesses casos, o teste t de Student foi utilizado para comparar os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos. Os vídeos foram incluídos utilizando o software PlusMZ e todas as análises e elaborações gráficas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia USA, www.graphpad.com.

3. RESULTADOS

A análise inorgânica do TE bruto, assim como suas diluições nas águas ofertadas aos animais mostrou elevada concentração de vários elementos químicos de toxicidade conhecida, tais como Ba, Cd, Pb, Cu, Hg, Ni, As, Cr, Sn, Ag e Si (Tabela 1S), sem a presença de coliformes fecais. Além disso, identificamos hidrocarbonetos monocromáticos e policíclicos diferentes (Figura 2S e Tabela 2S) de estrutura molecular complexa e pouco identificada em análises químicas orgânicas de rotina. Assim, confirmamos a alta complexidade química do TE, assim como reportado em estudos prévios que utilizaram diferentes tipos de TE Estrela et al. (2017), Mendes et al. (2017).

Quanto aos animais expostos a TE, não observamos sinais clínicos ao longo do período experimental indicativos de toxicidade sistêmica (tais como fraqueza, impossibilidade de andar ou permanecer em pé, letargia, respiração ofegante, cianose, regurgitação / vômito, tremor de melena, ataxia, inclinação da cabeça, convulsões e / ou cegueira) ou de desidratação (olhos aparentemente afundados ou sem brilho, pele ao redor dos com aparência enrugada ou membranas mucosas pegajosas ou secas). Não houve diferença estatística no consumo médio de água de todos os grupos [C: 44,4 mL/ave/dia; TE(1.4): 42.4 mL/ave/dia; TE(3.1): 44.06 mL/ave/dia; TE(6.5): 43.3 mL/ave/dia – H=4.107; p=0.250], o que nos permite descartar a possibilidade de algumas codornas beberem menos água por aversão a água poluída. No entanto, as codornas dos grupos TE(3.5) e TE(6.5) ingeriram maior quantidade de ração [C: 27.42 g/ave/dia; TE(1.4): 25.65 g/ave/dia; TE(3.1): 30.16 g/ave/dia; TE(6.5): 31.37 g/ave/dia – H=11.240; p=0.010].

O exame físico dos animais revelou diminuição da biomassa corpórea das codornas de todos os grupos experimentais (inicial vs. final) (Figura 3A), bem como aumento da biomassa relativa do fígado das aves dos grupos TE(1.4), TE(3.1) e TE(6.5) sem, no entanto, haver diferenças na biomassa cerebral (Figura 3B). É provável que a redução da biomassa corpórea das aves esteja relacionada à fase postural em que as codornas se encontravam ao longo do período experimental. Conforme bem conhecido na literatura, a biomassa corpórea das aves pode sofrer variação nas primeiras semanas de postura, uma vez que pode haver dispêndio do metabolismo energético voltado à produção dos ovos (Sefton & Siegel, 1973). Isso explicaria a redução da biomassa corpórea nas aves de todos os grupos experimentais. Por outro lado, o aumento da biomassa hepática pode estar relacionado a possíveis alterações hepáticas associadas com a ingestão de água contendo TE. Embora não tenhamos aprofundadas nossas análises em nível histopatológico, há consenso do aumento do peso do fígado em roedores devido à exposição a substâncias químicas pode ocorrer através de vários mecanismos e pode ser acompanhado por uma variedade de aparências histológicas diferentes, algumas das quais mostram claramente citotoxicidade e morte celular (Hall et al., 2012). O estudo de Rabelo et al. (2018) envolvendo a exposição crônica de camundongos Swiss (machos e fêmeas) a TE reforça a hipótese de ocorrência de danos hepáticos nas codornas expostas ao poluente. Na ocasião degeneração

hidrópica moderada foi observada nas regiões centro lobulares do fígado de camundongos expostos a 5 e 10% TE, bem como maiores quantidades de hepatócitos apresentando cariomegalia e hepatócitos necróticos, e uma menor quantidade de células Kuffer no fígado de camundongos expostos a o xenobiótico. Além disso, camundongos expostos a 10% TE apresentaram leve hiperplasia dos ductos biliares nas áreas portais e proliferação de fibroblastos ao redor dos ductos biliares, sugerindo um processo fibroso.

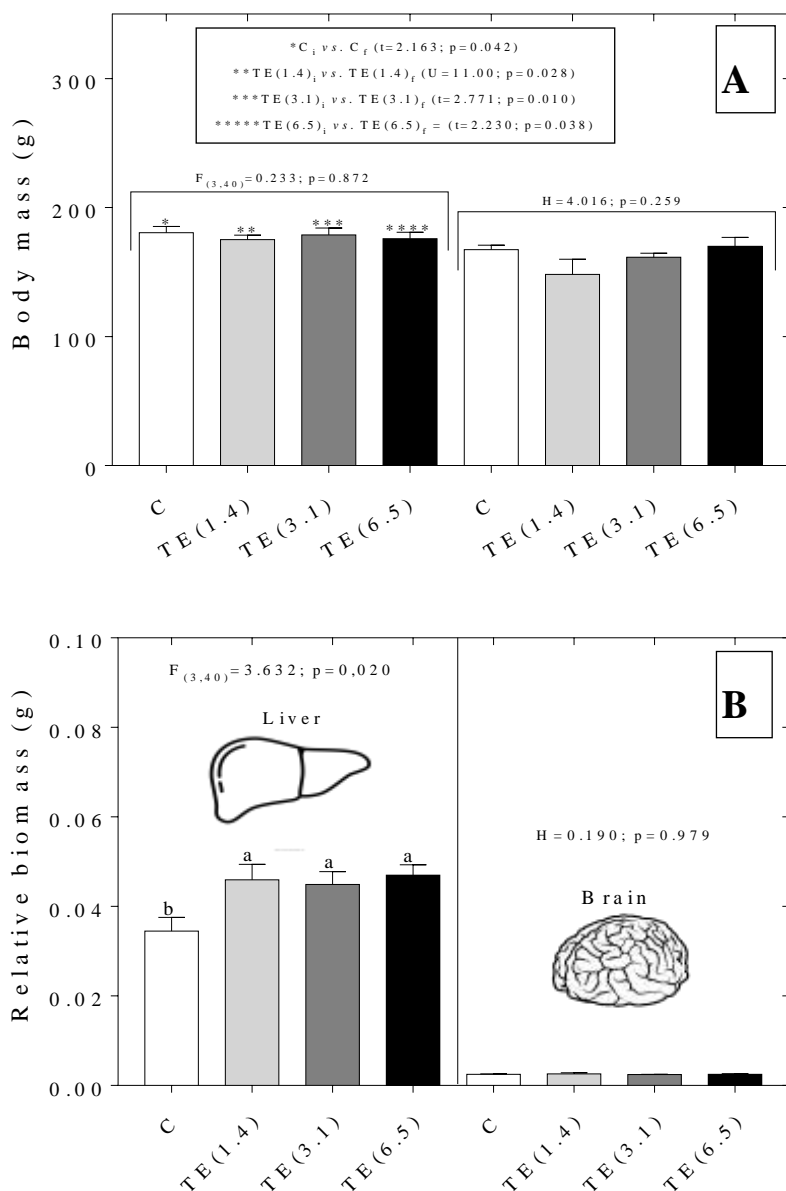
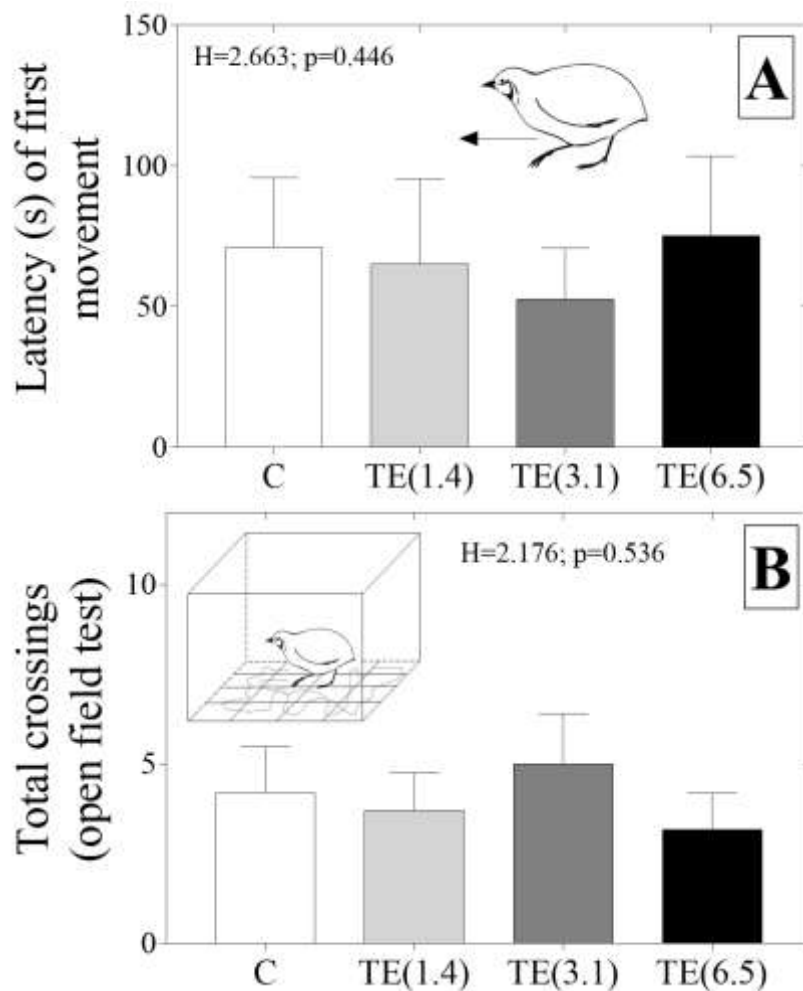


Figura 3. (A) Biomassa corpórea inicial e final e (B) biomassa relativa do fígado e cérebro de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume. As barras indicam a média + erro padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada)

Em relação aos testes comportamentais, as codornas expostas ao TE não apresentaram evidências de alterações locomotoras inferidas por meio da latência para a primeira locomoção e do

total de cruzamentos dos quadrantes traçados no assoalho do aparato do teste do campo aberto. Nestes casos não observamos diferenças entre os grupos experimentais (Figura 4A-B, respectivamente). No entanto, as aves dos grupos TE(1.4), TE(3.1) e TE(6.5) apresentaram reduzido tempo e frequência de exibição do comportamento de freenzing (Figura 4C), quando comparadas às aves do grupo controle. Esses dados, em particular, são semelhantes aos observados por De-Faria et al. (2018), ao exporem fêmeas de codornas à água concentrações ambientais de abamectina. Conforme discutido por Satterlee & Marin (2006), aumentos da exibição desse comportamento reflete diretamente um alto nível de estresse e ansiedade nesses animais, sendo o inverso relacionado a um efeito ansiolítico não-sedativo.



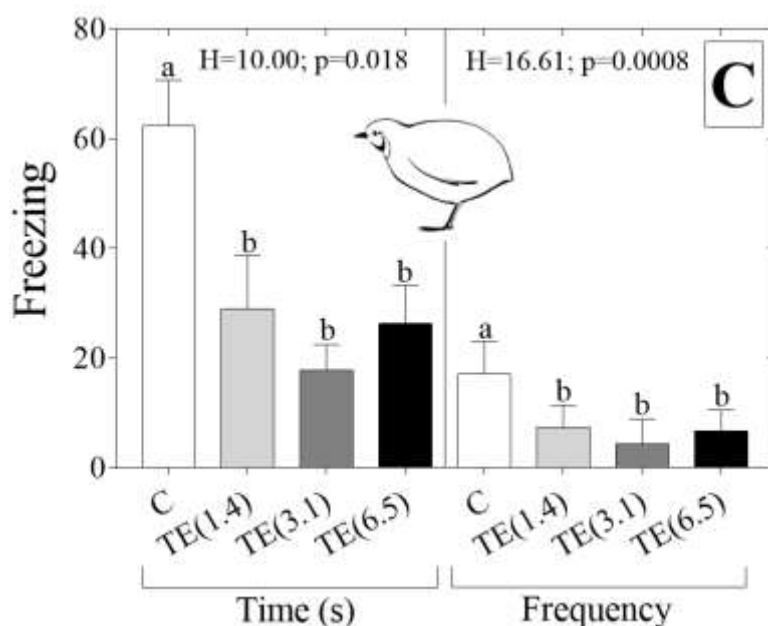


Figura 4. (A) Latência para o primeiro movimento; (B) total de cruzamentos dos quadrantes traçados no assoalho do campo aberto e (C) tempo e frequência de exibição do comportamento de freezing por *Coturnix coturnix japonica* expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume. As barras indicam a média + erro padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. C: controle; TE: grupos expostos a TE diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

Na literatura já foram reportados tanto efeito ansiogênico, quanto ansiolítico da exposição de distintos modelos animais a TE. Almeida et al. (2016), por exemplo, observaram que fêmeas de camundongos Swiss que ingeriram as diluições de TE 5% e 10% ingeridas apresentaram efeito ansiolítico (menor nível de ansiedade, maior porcentagem de tempo com braços abertos, maior tempo e frequência no comportamento de mergulho, menor tempo de espera e menor frequência de freezing). Por outro lado, Guimarães et al. (2017), utilizando grupos de controle farmacológico não observaram efeito ansiogênico ou ansiolítico da exposição oral de machos e fêmeas de camundongos Swiss a TE. Já Souza et al. (2017) ao exporem cronicamente camundongos C57Bl/6J a TE observaram comportamento compatível com o aumento da ansiedade nos animais que ingeriram água contendo TE (0.1, 1 and 5%) – i.e.: efeito ansiogênico do poluente. As discrepâncias entre esses estão relacionadas certamente ao tipo de TE testado e à sua composição química, à via e ao período de exposição, além das características biológicas distintas dos modelos animais avaliados. De todo modo, os dados obtidos no presente estudo, aliado aos já relatados em roedores expostos a TE sugerem fortemente ação neurotóxica do poluente, ora em vias neurais que levam ao aumento da ansiedade, ora à diminuição do estresse e, conseqüente efeito ansiolítico.

Em relação ao teste de reconhecimento de objetos, nossos dados mostram que as codornas do grupo controle exibiram com menos frequência e tempo o comportamento de freezing (Figuras 5A-B), o que pode ser explicado pela maior frequência de exibição do comportamento de 'alta postura',

quando o objeto novo foi introduzido na caixa onde se encontravam (segunda sessão do teste) (Figura 5C). Esses dados indicam reação alerta clara à novidade e ao medo, uma vez que este teste permite avaliar se as aves são capazes de reconhecer um novo objeto (de cores diferentes) e inferir a percepção do animal sobre o meio ambiente, suas habilidades cognitivas e emocionais (medo e ansiedade) (Taylor et al., 1969; Salzen et al., 1971; Forkman et al., 2007; Fernandes et al., 2015; De-Faria et al., 2018). No entanto, as aves expostas à TE não tiveram o seu comportamento (de 'alta postura') influenciado por estar na segunda sessão de teste, (Figura 5C). Nesse caso, uma ingestão de água sustentou que o TE pode ter influenciado negativamente a habilidade de reconhecer o objeto colocado no ambiente familiar, e explicaria sua falta de resposta ao objeto.

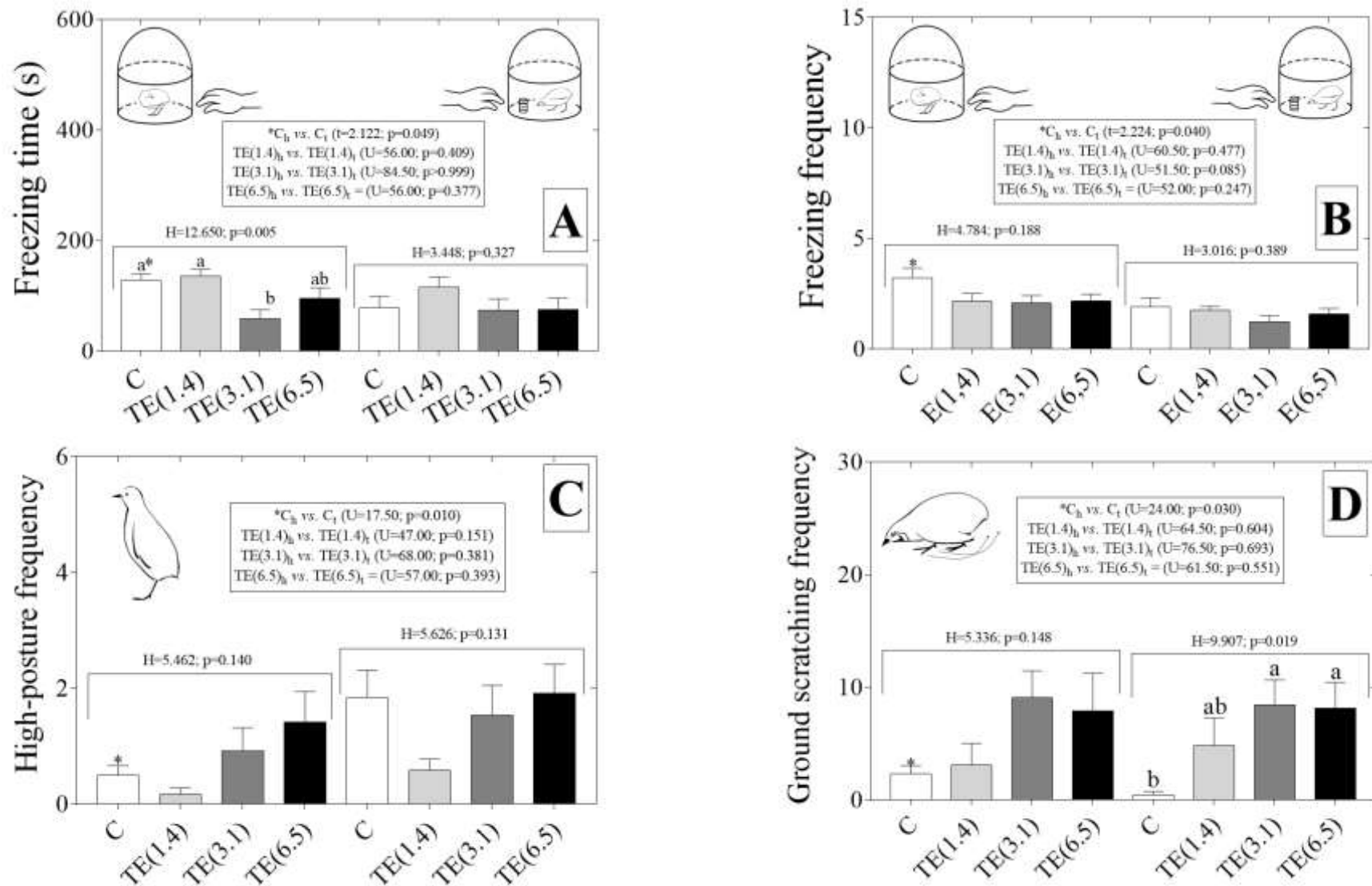


Figura 5. (A) Tempo e (B) frequência de exibição do comportamento de congelamento, (C) frequência de exibição do comportamento de high-posture e (D) e de ground scratching de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. As barras indicam a média + erro padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada)

Resultados semelhantes foram observados em relação ao comportamento de ‘ciscar’ no assoalho da caixa durante o teste de reconhecimento de objetos. As aves expostas ao poluente não reduziram tal comportamento na presença do objeto, como observado nas codornas do grupo controle (Figura 5D). É sabido que todas as codornas dedicam parte do seu tempo (aproximadamente 8%) para ciscar e forragear procurando sementes e invertebrados no campo (Schmid & Wechsler, 1997). Além disso, comportamento de banho de poeira acontece de modo discreto em *C. coturnix japonica*, cada um dos quais é composto da seguinte sequência de padrões de comportamento de componentes: movimentos de raspagem com o bico, arranhar ou raspar movimentos com as pernas, jogar poeira no ar com as asas e ondular o corpo sob o chuveiro, esfregando a cabeça e o corpo no pó, e pena vigorosa agitando e sacudindo (Borchelt, 1977; Statkiewicz & Schein, 1980; Gerken & Petersen, 1987; Mills et al., 1997). No entanto, a percepção de qualquer sinal de perigo ou alerta, reduz ou interrompe imediatamente a exibição do comportamento de ‘ciscar’ (Mills et al., 1997). Portanto, esses resultados em associação com aqueles referentes à exibição do comportamento de freezing no teste do campo aberto, reforçam a hipótese de que o TE cause efeito ansiolítico em codornas, supostamente diminuindo sua reação à novidade e ao medo (sem efeito sedativo).

Nós também avaliamos se a ingestão de água contendo TE poderia influenciar a capacidade predatória das codornas, isto é, de forragear invertebrados. Assim, ao confrontarmos as codornas com larvas falsas e verdadeiras de *T. molitor*, observamos clara resposta predatória das aves livres de TE. O maior tempo de exploração e da frequência de bicadas nas larvas verdadeiras pelas codornas do grupo controle demonstram que essas aves foram capazes de explorar a novidade (representada pelas larvas), bem como diferenciar a larva verdadeira da falsa indicando clara resposta inata predatória (Figura 6A-B). Contudo, as codornas expostas ao TE não apresentaram a mesma performance comportamental quando confrontadas com as larvas, uma vez que não observamos diferenças significativas entre o tempo de exploração e da frequência de bicadas das larvas verdadeiras e falsas (Figura 6A-B).

Além disso, o menor tempo de latência para comer a larva verdadeira durante a segunda vez em que as codornas do grupo controle e as larvas foram confrontadas, sugere a aquisição de memória alimentar e maior ferocidade predatória desses animais, o que não foi observado nas aves expostas ao TE (Figura 6C). Neste último caso, o maior IP apresentado pelas codornas controle (Figura 6D) confirma nossa hipótese. Portanto, nossos dados sugerem influência negativa dos constituintes químicos do poluente em mecanismos ou estruturas neurais correlacionadas com o instinto predatório das codornas que, em ambiente natural, poderia impactar drasticamente o fitness dos indivíduos e a dinâmica de suas populações.

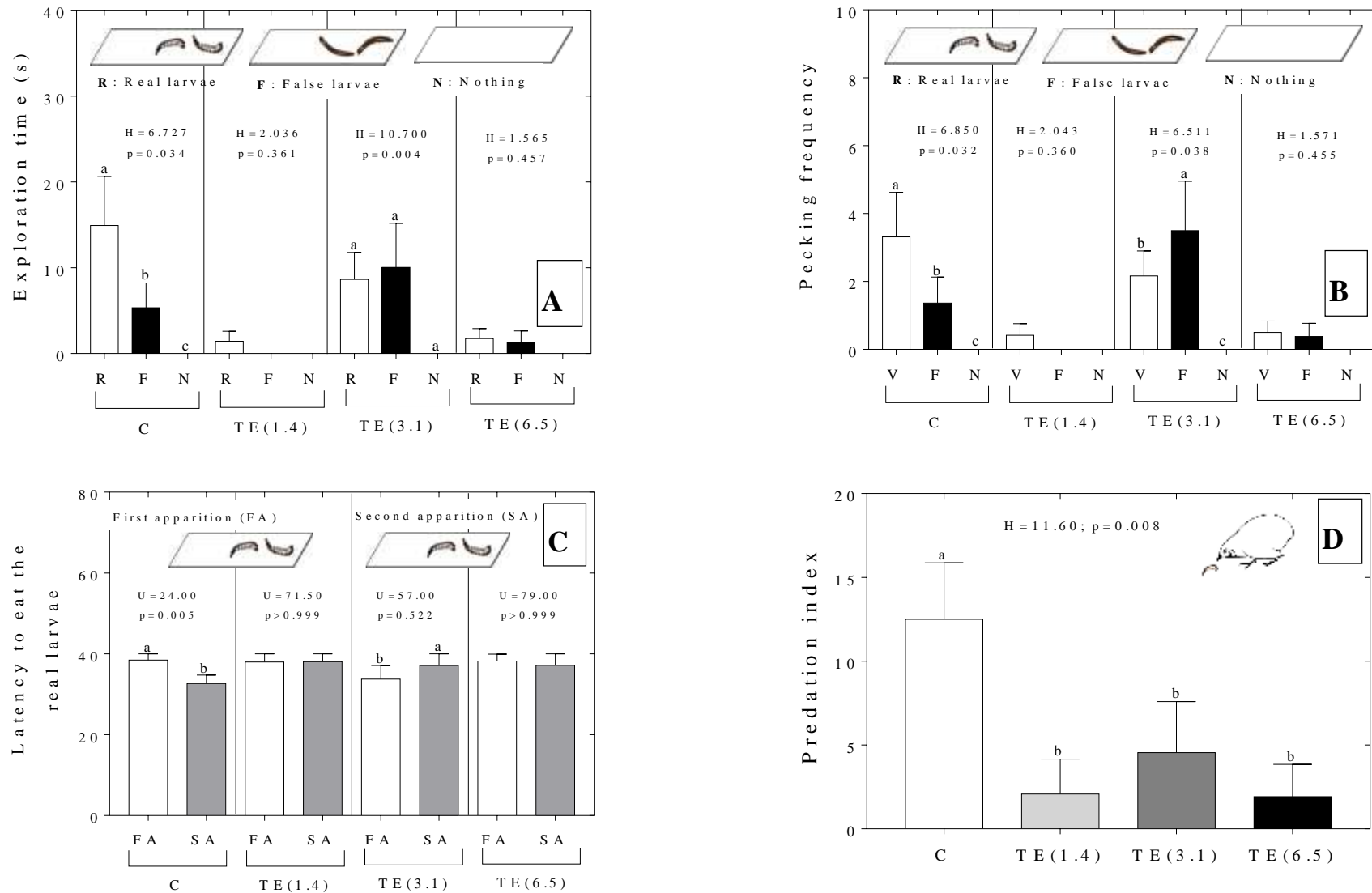
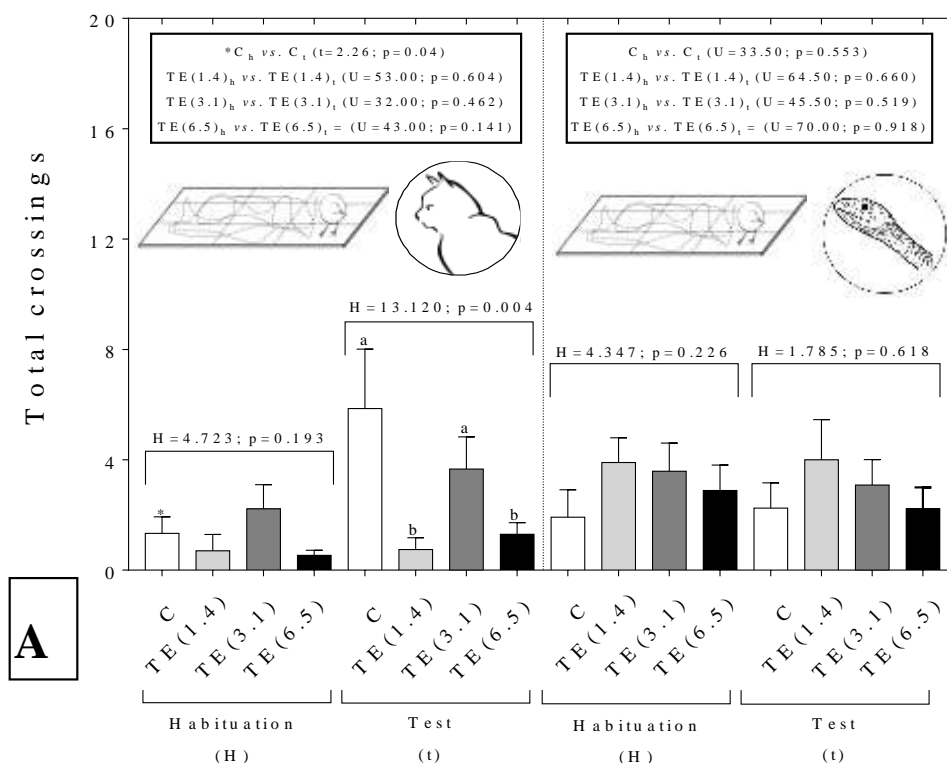


Figura 6. (A) Tempo (s) e (B) frequência de exploração das lâminas contendo ou não as larvas (verdadeiras e falsas), (C) latência para comer as larvas verdadeiras e (D) índice de predação de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume. As barras indicam a média + desvio padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Na literatura especializada não encontramos estudos que também tenham avaliado o efeito de poluentes sobre a capacidade predatória de codornas japonesas, seja em ambiente laboratorial ou natural. No entanto, estudos de modelagem matemática (Bårdsen et al., 2018) e de campo (Brotons et al., 1998; Currie & Valkama, 1998; Ortega, 2012) envolvendo diferentes espécies de aves reportam evidências de que estressores ambientais, incluindo os poluentes químicos, podem afetar a capacidade de forrageio das aves, interferindo diretamente no equilíbrio das espécies de predadores e presas. Ainda não há consenso sobre como os diferentes poluentes podem afetar a capacidade de forrageamento das aves. Porém, é provável que os mecanismos fisiológicos que modulam a fome, saciação e análise de custo energético dispendido para a captura de presas sejam afetados, bem como a capacidade perceptiva do ambiente e de análise da qualidade dos habitats. Além disso, fatores não-energéticos como a percepção do risco de predação (influenciado pelo estado emocional dos animais) podem ter influência no comportamento de forrageio das aves que habitam ou que frequentam locais poluídos.

Outra resposta comportamental avaliada em nosso estudo foi aquela exibida quando as codornas eram confrontadas com seus potenciais predadores (felino e ofídico). Inicialmente observamos que as codornas do grupo controle, diferentemente das aves expostas ao TE, apresentaram maior atividade locomotora na presença do gato (Figura 7A), o que sugere desorientação das aves na circunstância conflitante provocada pelo teste. Além disso, o tempo de permanência das codornas expostas ao poluente nas zonas aversivas e de segurança, na ausência e presença do gato, não diferiram, como observado nas aves do grupo controle (Figura 7B-C).



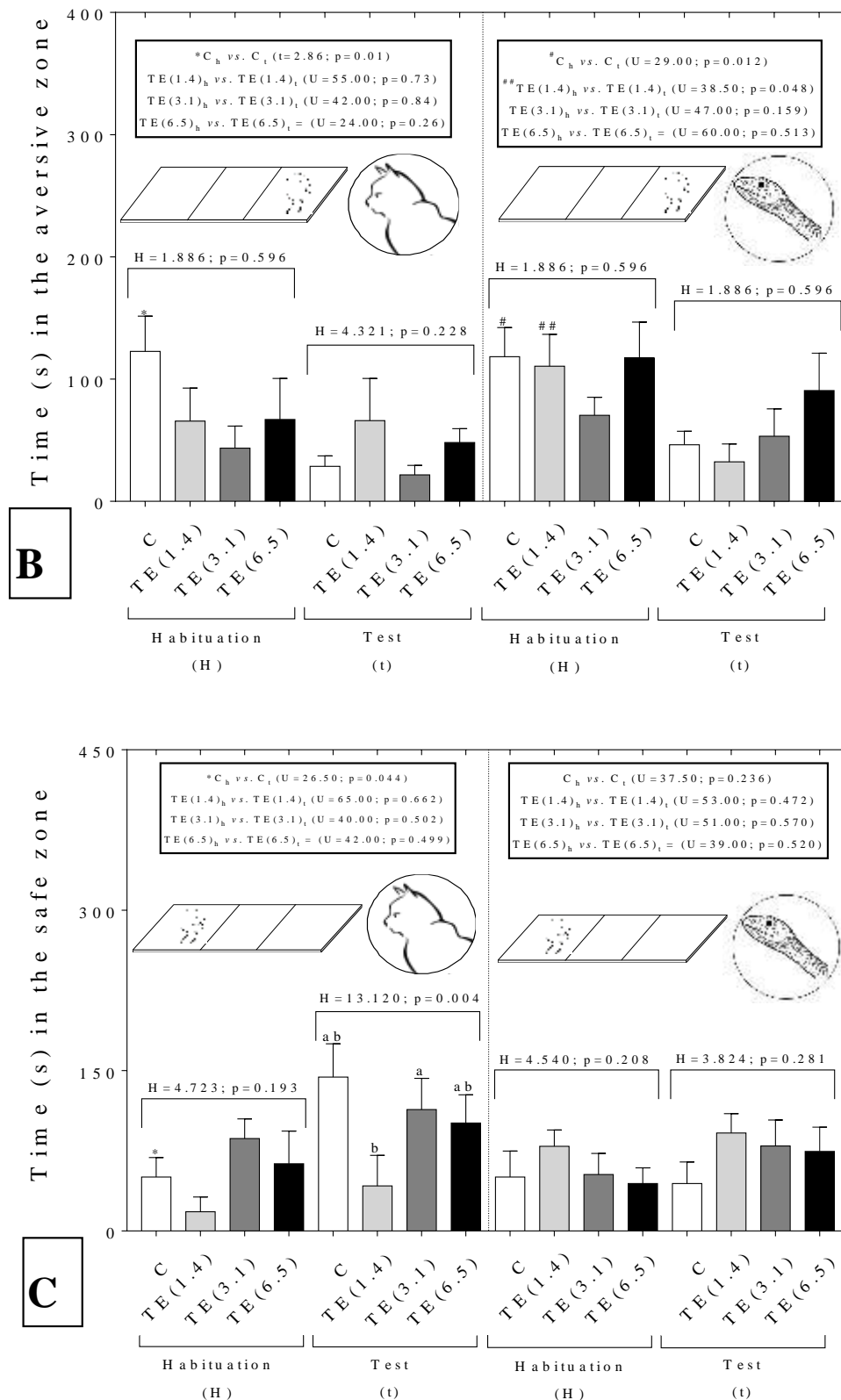


Figura 7. (A) Total de cruzamentos dos quadrantes traçados no assoalho do aparato e tempo de permanência nas zonas (A) aversiva e de (B) segurança, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. As barras indicam a erro + desvio padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: control; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

Quanto ao teste de resposta ao predador ofídico, observamos apenas que os grupos controle e TE(1.4) permaneceram menos tempo na zona aversiva quando a cobra estava presente no aparato (Figura 7B), tendo permanecidas na zona neutra do aparato, já que não observamos variação no tempo de permanência na zona de segurança. Assim, é plausível interpretar esse resultado como uma resposta defensiva mais branda das aves controle e do grupo TE(1.4) à cobra, quando comparada com aquela exibida na presença do gato. Nesse caso, é possível que as aves não tenham identificado a cobra como uma iminente ameaça predatória, sendo os estímulos desse potencial predador (visual, olfatório e auditivo) pouco eficazes para provocar a percepção do risco e, conseqüentemente, ativação de áreas envolvidas com o medo que levassem a uma resposta defensiva mais clara, como ocorreu na presença do gato. This assumption is reinforced by de-Oliveira-Crisanto et al. (2015) e Souza et al. (2018), que não encontraram resposta defensiva em camundongos machos Swiss eC57Bl/6J expostos ao cheiro de cobra, respectivamente. Ao tempo. Em que os autores sugerem que o estímulo olfatório (no caso de de-Oliveira-Crisanto et al., 2015) ou olfatório, visual e auditivo (no caso de Souza et al., 2018) a dica da cobra pode ter sido considerada um novo, mas não ameaçador, estímulo pelos roedores. De todo modo, nossos dados de resposta defensiva antipredatória (principalmente ao gato) são particularmente importantes, já que uma das decisões mais importantes que o animal precisa tomar é como responder ao ataque de um predador em potencial, especialmente em circunstâncias conflitantes como a induzida em nosso estudo, podem aumentar o risco de predação e, conseqüentemente, influenciar a dinâmica populacional da espécie presa. Embora nosso estudo seja pioneiro em demonstrar o impacto do TE na resposta antipredatória de *C. coturnix japonica*, estudos prévios também envolvendo galináceos (Mesak et al., 2018 – nanopartículas de ZnO; de-Faria et al., 2018 – abamectina) e outros modelos animais (e.g.: girinos: Amaral et al., 2018abc – TE, abamectina e mistura de diferentes drogas farmaceuticas; roedores: Mendes et al., 2017 – TE; Mendes et al., 2018 – haloxyfop-p-methyl ester; Souza et al., 2018 – mix de poluentes) já relataram déficits responsivos causados pela exposição dos animais a distintos outros poluentes. Tais estudos sugerem que os mecanismos de ação dos poluentes responsáveis pelos déficits responsivos podem ser complexos e variados, de acordo com os modelos animais. Isso incluiria efeitos que podem ir desde aqueles que afetam os circuitos hipotalâmicos diretamente envolvidos nas respostas antipredatórias (Martinez et al., 2008; Wang et al., 2015; Kunwar et al., 2015) até aqueles que modulam o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o qual afeta, por exemplo, a produção de hormônios - como a corticosterona -, que são claramente aumentados em animais expostos a potenciais predadores (Anisman et al., 2001; Amaral et al., 2009; Grace et al., 2017).

Em nosso estudo, a constituição química complexa do TE (Tabelas 1-2S e Figura 2S) dificulta o entendimento sobre como esse conjunto de poluentes possa ter agido nos organismos das codornas. Mas, o efeito ansiolítico observado nos testes do campo aberto (Figura 4) e no de reconhecimento de

objetos (Figura 5) reforçaram a hipótese de que houve mudanças no eixo HPA e que tais mudanças levaram a um estado anatómico e ao déficit responsivo sem causar sedação ou hiperatividade. Partindo do pressuposto de que os mesmos mecanismos que podem levar a danos comportamentais podem causar prejuízos celulares (e.g.: danos oxidativos), avaliamos os possíveis efeitos mutagênicos do TE em eritrócitos circulantes das aves. Conforme pode ser observado na Figura 8A, as codornas expostas a TE apresentaram maior frequência de anormalidades eritrocitárias, especialmente constrição assimétrica e simétrica (Figura 8B), núcleos deslocados (Figura 8B), micronúcleos e núcleo deslocado (Figura 8C), bem como eritrócitos anucleares (Figura 8D). A Figura 9 apresenta imagens de microscopia óptica das principais anormalidades eritrocitárias identificadas. Apesar dos mecanismos de ação dos constituintes químicos do TE em nível celular não terem sido investigados, é consenso que as anormalidades nucleares identificadas podem estar relacionadas à quebra cromossômica ou a disfunções do aparato mitótico durante as divisões celulares. Isso é especialmente válido para a formação de micronúcleos (Fenech, 2000).

Por outro lado, um núcleo constrimental assimétrico / simétrico constringido e um núcleo indentado podem representar diferentes precursores de micronúcleos ou binúcleos (Crott & Fenech, 2001). Esses dados são semelhantes aos observados por Souza et al. (2017), quando machos e fêmeas de periquitos australianos (*Melopsittacus undulates* - Psittaciformes) foram expostos à ingestão de água contendo TE (diluído a 5%) durante 60 dias. Ainda que hajam diferenças marcantes entre os delineamentos experimentais adotados em nosso estudo e no trabalho de Souza et al. (2018), incluindo constituição química do TE utilizado, modelo animal, período de exposição, dentre outros; nossos dados confirmam o potencial mutagênico dos TE.

Um dado especialmente interessante diz respeito à alta frequência de núcleos deslocados nos eritrócitos tanto de *M. undulates* (Souza et al., 2017), quanto de *C. coturnix japonica* expostos a TE (Figura 8B e Figura 9B1). Conforme sugerido por Souza et al. (2017), essas alterações podem estar relacionadas a modificações estruturais nas células (tais como elementos do citoesqueleto ou similares) que mantêm a posição central dos núcleos eritrocitários, levando à rotação / deslocamento de núcleos. Também não é possível afirmar que é possível que os danos encontrados nas células do TE tenham ocorrido nas proteínas ou nos mecanismos formadores de microtúbulos, microfilamentos e / ou filamentos intermediários. Logo, ainda que preliminarmente, tal anormalidade parece ser um biomarcador de toxicidade do TE em modelos aviários, já que até o presente momento nenhum outro estudo sobre mutagenicidade e TE – em outros modelos animais – relatou anormalidade nuclear semelhante (Matsumoto et al., 2006; Amaral et al., 2018; Zehao et al., 2018). Portanto, para além da confirmação do potencial mutagênico do TE em aves, nosso estudo demonstra pioneiramente que galináceos (tais como *C. coturnix japonica*) também podem sofrer danos mutagênicos em decorrência da ingestão de água contendo esse complexo poluente.

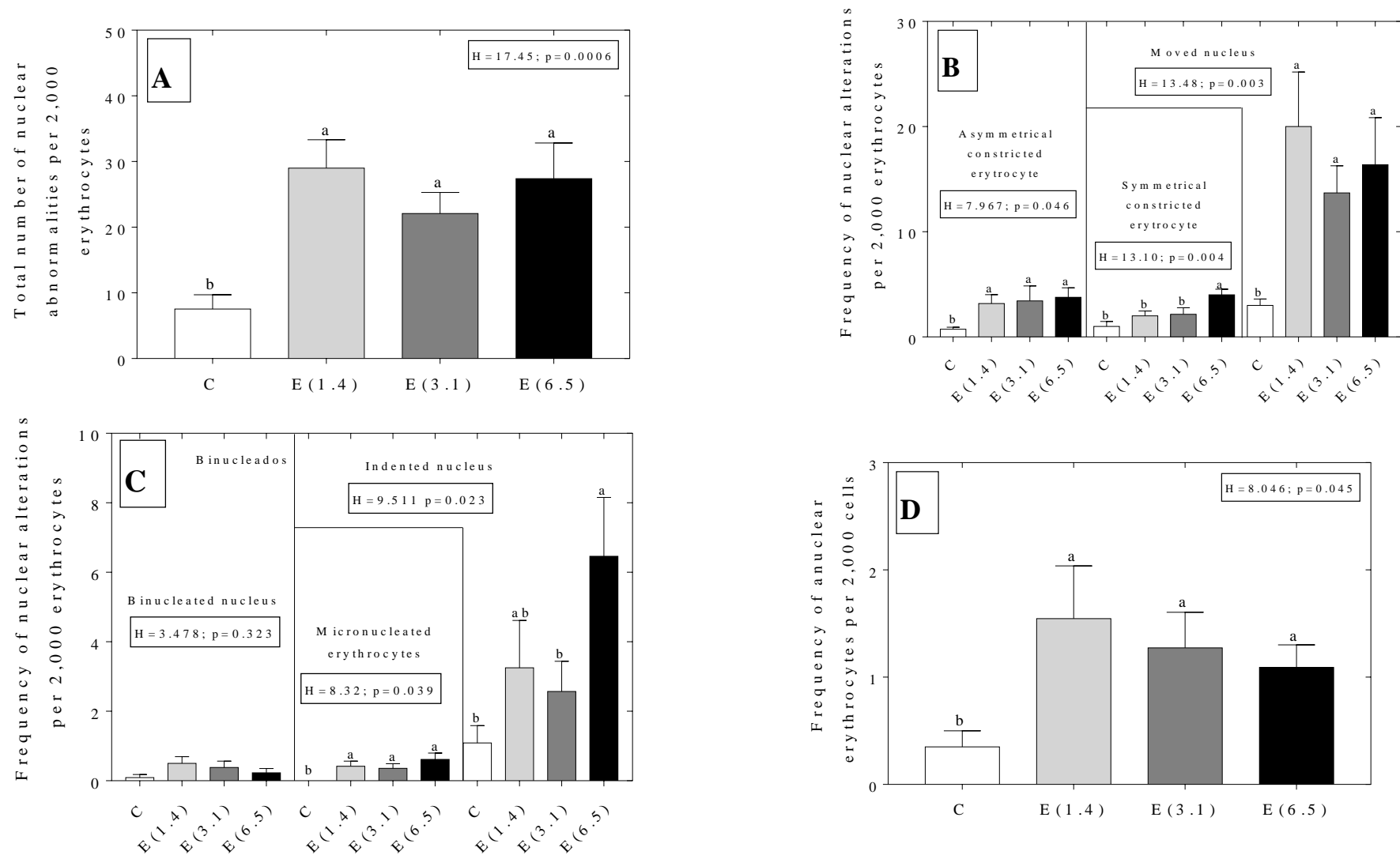


Figura 8. (A) Total de anormalidades nucleares eritrocitárias, (B) de núcleos assimétricos, simétricos e deslocados, (C) eritrócitos binucleados, micronucleados e indented nucleus e (D) anuclear erythrocytes de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. As barras indicam a erro + desvio padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: control; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

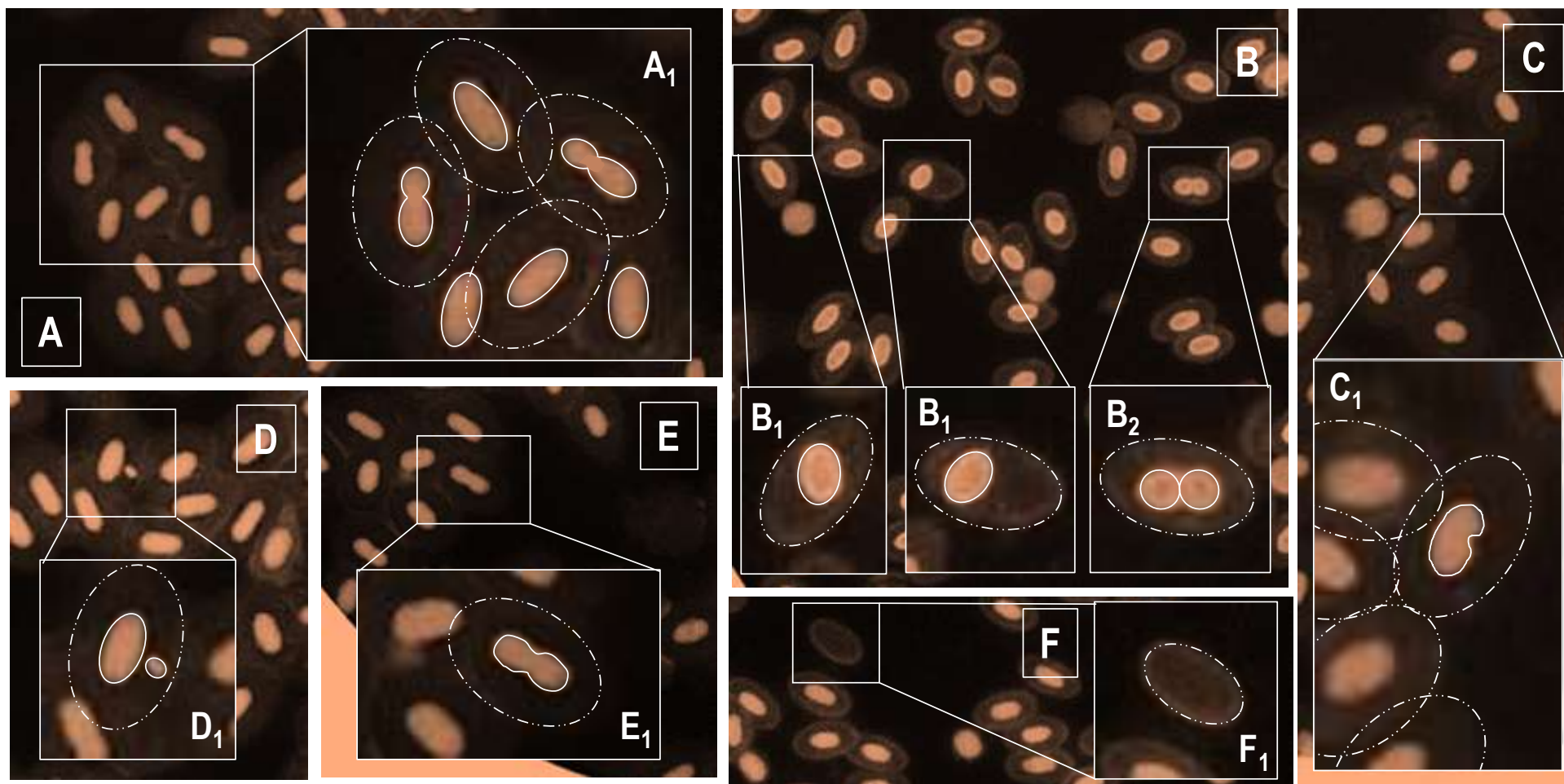


Figure 9. Fotomicrográficas que representam as anormalidades nucleares mais frequentemente observadas em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. (A-A1): eritrócito constricto assimétrico; (B-B1): núcleo movimentado; (B-B2): eritrócito binucleado; (C-C1): núcleo reniforme; (D-D1) eritrócito micro nucleado; (E-E1): eritrócito constricto simétrico; e (F-F1): eritrócito anuclear. As lâminas com o esfregaço de sangue foram coradas com Panótico Rápido® (New Prov), após a fixação. No entanto, um filtro negativo foi aplicado às fotomicrográficas para permitir uma melhor visualização da estrutura nuclear.

Finalmente, investigamos se a ingestão de água contendo TE afetaria aspectos reprodutivos das codornas, a partir de parâmetros ligados à postura e às características dos ovos produzidos. Conforme discutido por Dordrecht (1992), falhas em aspectos reprodutivos podem ser considerados indicadores sensíveis de impacto da poluição sobre a biota. Embora nossos dados não apontem para alterações nos parâmetros de área superficial dos ovos (Figura 4S-A), volume dos ovos (Figura 4S-B), índice de forma (Figura 4S-C) e no percentual de casca (Figura 4S-D), a produção de ovos/dia/codorna nos grupos expostos a TE foi inferior [(TE(1.4): 0.268 ovo; (TE(3.1): 0.250 ovo; (TE(6.5): 0.242 ovo] à do grupo controle (C: 0.412 ovo) (Figura 10A). Além disso, os ovos produzidos pelas codornas expostas ao poluente apresentaram menor biomassa (Figura 10A) e menor espessura da casca (Figura 10B).

Estudos sobre o desempenho de poedeiras comerciais, frequentemente associam os parâmetros de conversão e eficiência alimentar à produção de ovos pelas aves e, com base nisso, investigamos se a exposição ao poluente poderia afetar essas variáveis bioquímicas. Interessantemente, nossos dados revelam que as aves expostas ao TE apresentaram maior índice de conversão alimentar (Figura 10C) e menor eficiência alimentar (Figura 10D), quando comparadas ao grupo controle. Logo, isso indica que essas aves apresentaram pior desempenho produtivo, pois uma quantidade maior de ração teve que ser ingerida para produção de ovos e, ainda assim, seu aproveitamento metabólico foi reduzido. Enquanto a análise de correlação entre a biomassa dos ovos/dia/codorna e o índice de conversão alimentar mostrou-se negativa (Correlação Pearson; $r = -0.332$; $R^2: 0.110$; $p=0.012$), para a eficiência alimentar observamos uma correlação positiva (Correlação de Pearson; $r = 0.280$; $R^2: 0.078$; $p=0.036$).

Com o aumento da ingestão de ração, aumentam-se os gastos de energia para digestão, que implica em realocação de energia metabolizável ingerida para o processo fisiológico digestivo ao invés daqueles relacionados à produção dos ovos. As causas dessas alterações são ainda desconhecidas e não podemos descartar a hipótese de que a combinação de diferentes elementos químicos (de toxicidade conhecida) possa ter influência negativa nos processos metabólicos. A correlação negativa observada entre a eficiência alimentar e a biomassa hepática (Correlação de Pearson; $r = -0.686$; $R^2: 0.470$; $p=0.019$), por exemplo, reforça a hipótese de disfunções metabólicas em nível hepático, as quais podem ter ocorrido em decorrência da exposição dos animais ao poluente. Além disso, não podemos descartar a hipótese do efeito ansiolítico causado pelo TE – observado nos testes comportamentais – ter afetado a produção dos ovos. Conforme demonstrado por Lewis & Morris (2000) a ativação excessiva do sistema serotoninérgico pode levar à diminuição de hormônios sexuais que impactam diretamente na produção de ovos.

Se para os sistemas avícolas, o elevado e o reduzido índice de conversão e eficiência alimentar, respectivamente, associam-se a perdas lucrativas (Fuentes, 2007), no ambiente natural tais condições

implicam nas aves necessitarem dispender maior demanda energética para procura de recurso alimentar, expondo-se mais a possíveis predadores. Em situações de escassez alimentar, a busca por recursos pode ser demorada e o tempo de exposição à predação pode ser ainda maior, aumenta-se o risco de predação.

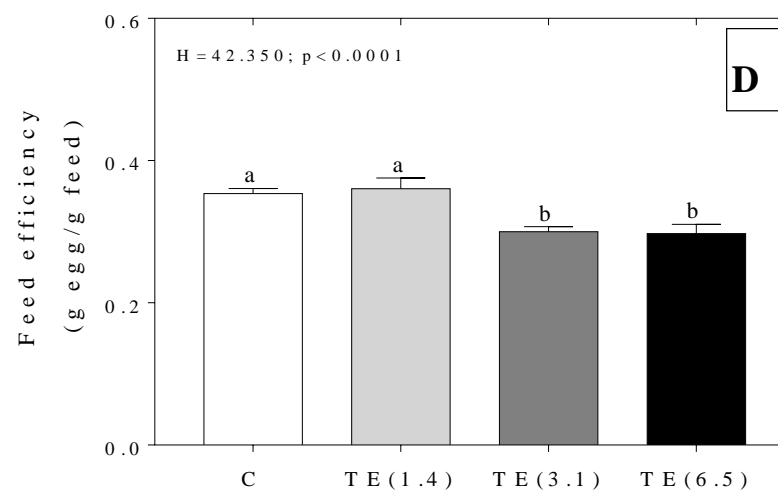
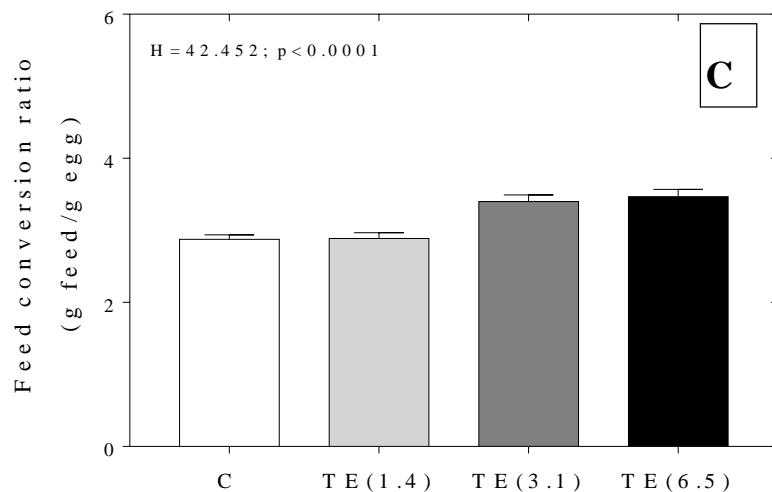
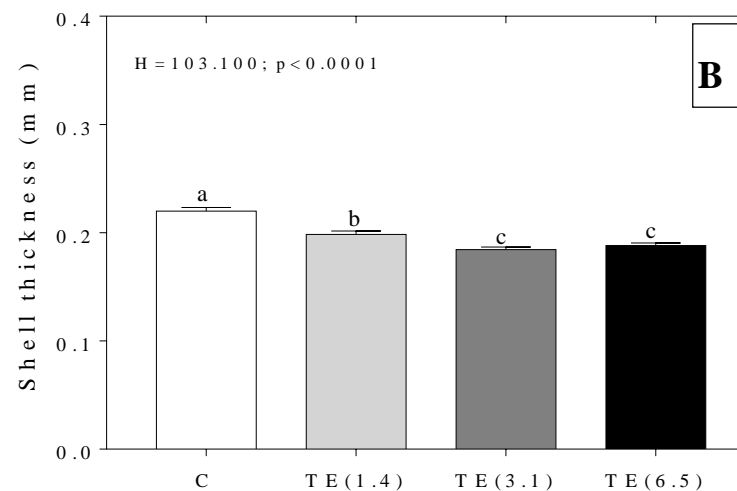
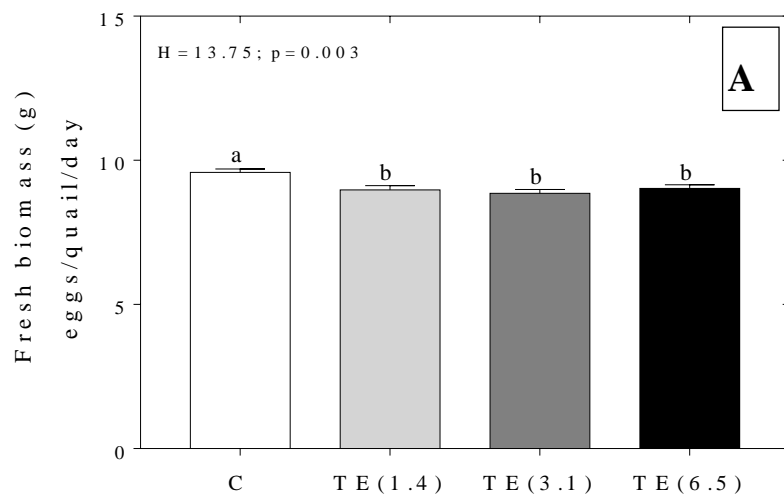


Figura 10. (A) Biomassa fresca e (B) espessura da casca de ovos, (C) taxa de conversão alimentar (D) eficiência alimentar de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. As barras indicam o erro + desvio padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

Quanto à menor espessura da casca dos ovos, múltiplos fatores podem influenciar os processos de formação das camadas da casca e, portanto, explicar os resultados observados. Conforme demonstrado por Nys et al. (2004), a casca de ovo é formada por carbonato de cálcio (96%); os componentes restantes incluem matriz orgânica (2%), magnésio, fósforo e uma variedade de oligoelementos (Nys et al. 2004; Ribeiro et al., 2016). Se por um lado, as concentrações desses elementos nas águas de exposição (Tabela 1S) parece não ser influentes; de outro, suas disponibilidades podem ter sido afetadas ao interagirem com outros componentes inorgânicos ou orgânicos do TE que, sabidamente, afetam a biodisponibilidade desses minerais (Scheuhammer, 1991). Essa interação poderia, por si só, mobilizar (indisponibilizar) os metais necessários para a formação da casca dos ovos, ainda que ingeridos em grandes quantidades (via ração acrescida da ingestão de TE).

Em adição, efeitos prejudiciais na flora intestinal causados pelo TE também podem ter interferido na metabolização de compostos que favorecem a absorção desses minerais [tais como o ananogossacarídeo; Oliveira et al. (2008)], além de ter ocorrido interferência na mobilização de Ca para glândula da casca. Essa última hipótese é corroborada por Lundholm (1997) ao associar o afinamento da casca de ovos com exposição de diferentes espécies de aves ao diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Lundholm, 1997). De qualquer forma, é importante ressaltar que a produção de ovos com cascas finas pode impactar direta e negativamente o desenvolvimento embrionário das aves, além de serem mais susceptíveis à quebra durante a incubação e à entrada de microrganismos patogênicos (Orlowski et al., 2017b).

Nós também observamos efeito significativo da ingestão de água contendo TE sobre aspectos da coloração/pigmentação dos ovos produzidos. A análise da variação amostral e do coeficiente de variação mostrou que as codornas expostas ao poluente produziram ovos de menor variação fenotípica relacionada ao padrão de manchas (castanho-escuras ou negras salpicadas), quanto de cores de fundo (Figura 11A-B, respectivamente), em comparação com o grupo controle. Enquanto a tonalidade das manchas sofreu um aumento linear com o incremento das diluições de TE na água (1.4% > 3.1% > 6.5%; Figura 11C), a tonalidade da coloração de fundo foi reduzida (Figura 11D) (maior proporção das colorações esverdeada e azulada).

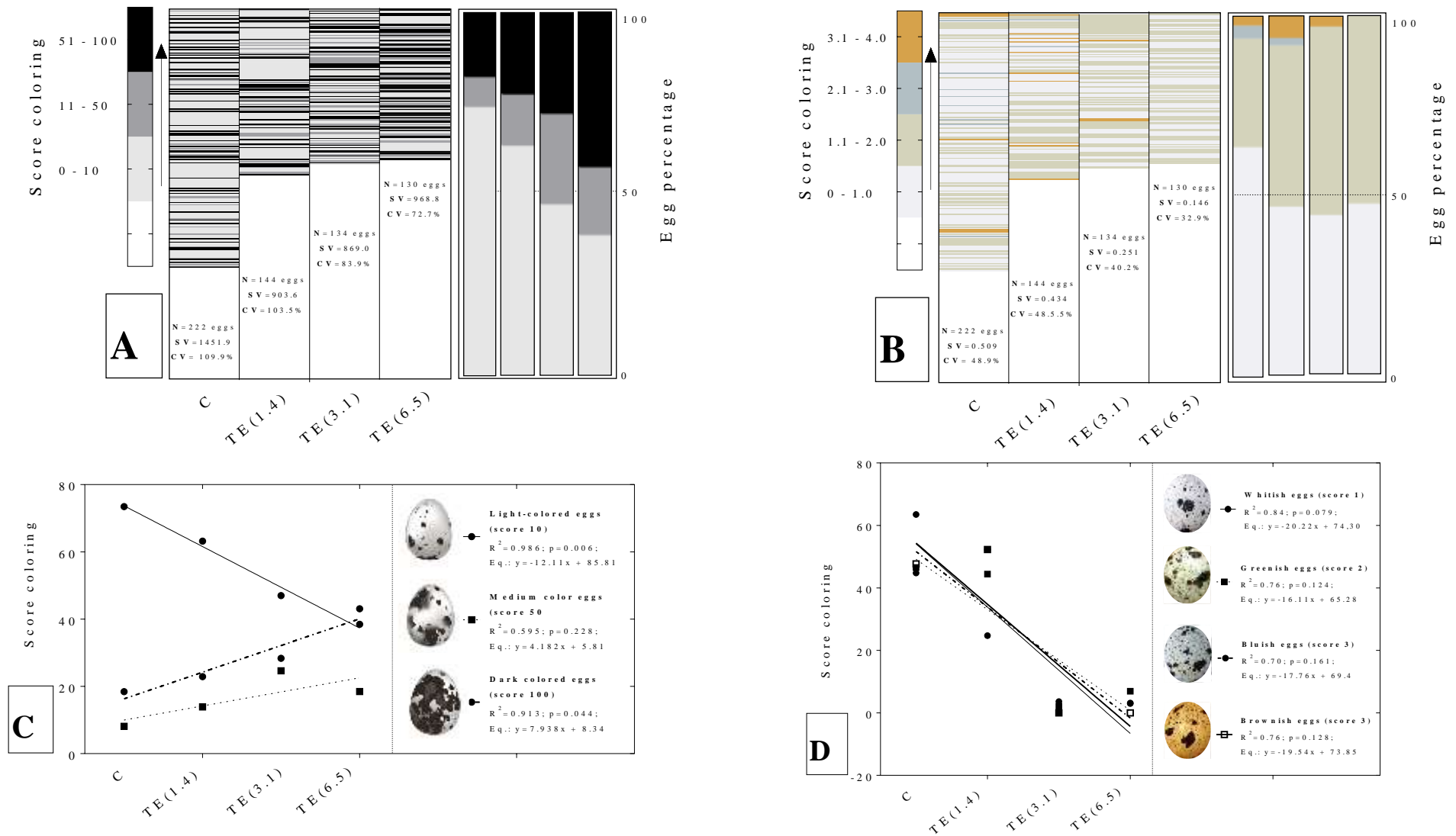


Figura 11. (A) Escores de coloração dos ovos produzidos relacionados ao padrão de manchas (A) e cor de fundo das cascas dos ovos produzidos por codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. C: controle; TE: grupos expostos a TE diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

É fato que os mecanismos de toxicidade que explicariam nossas observações ainda precisam ser investigados, podendo ser tão complexos quanto a constituição química do TE testado. No entanto, algumas relações observadas entre nossos dados podem ser úteis para direcionar estudos futuros. A menor espessura da casca dos ovos coincide precisamente com o padrão esverdeado-azulado das cores de fundo observado nos ovos das codornas expostas ao TE (correlação de Pearson $r = 0.897$; $R^2: 0.804$; $p < 0.0001$), o que indica que falhas nos processos de pigmentação das cascas na glândula de concha também podem ter ocorrido. O incremento da coloração esverdeada nos ovos de *Accipiter nisus* (Gavião) (maior produção do pigmento biliverdina) acompanhado do aumento da exposição dos animais ao dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), corrobora essa hipótese (Burgers, et al., 1986). Além disso, ovos mais claros de *Chlamydotis undulata macqueennii* também foram aqueles mais finos, com maior número de poros e maior permeabilidade à água, quando comparados com ovos de coloração escura (Baggott et al., 2002).

Por outro lado, o aumento linear da frequência de ovos com alta densidade de manchas escuras produzidos pelas codornas expostas ao TE (Figura 11D) coincide com a elevada frequência de alterações nucleares eritrocitárias nessas aves (Correlação de Pearson; $r = -0.632$; $R^2: 0.400$; $p = 0.027$). Nesse caso, é possível que tenha ocorrido incremento excessivo na síntese de protoporphyrin IX pelos eritrócitos alterados (Figura 9), uma vez que tal pigmento é o principal responsável pela escura coloração de casca (Li et al., 2013; Wilson, 2017). O efeito mutagênico do TE (em nível cromossomal) observado em nosso estudo, sugere que essas alterações também podem ter ocorrido em nível de DNA, exacerbando, por exemplo, a expressão de genes que codificam enzimas que facilita o acúmulo de protoporphyrin IX na glândula de casca (e.g.: gene ABCG2 – Li et al., 2013) e de genes que apresentam papel crucial na coloração da casca dos ovos de galiformes (e.g.: genes RHOA, SDF4 and TNFRSF4 – Liu et al., 2018).

É possível plausível supor também que em função dos prejuízos orgânicos causados pelo TE, possa ter havido maior alocação de biliverdina para a casca dos ovos, já que o pigmento (responsável pela coloração esverdeada-azulada) está envolvido em importantes funções de manutenção, como defesas imunes e antioxidantes (Morales et al., 2011; Cassey et al., 2012). Logo, a maior proporção de ovos com coloração de fundo esverdeada-azulada pode ter relação direta com mecanismos de proteção do embrião contra possíveis danos que o TE possa causar. Relatos de Soler et al. (2008) – envolvendo passarinhos selvagens - indicam que a coloração de ovos baseada em biliverdina é restrita quando as fêmeas sofrem com a condição corporal prejudicada. Além disso, uma biliverdina é comercializada com defesas antioxidantes quando o esforço reprodutivo da fêmea é experimentalmente aumentado (Morales et al. 2008). Nessa linha de raciocínio, prevê-se que a biliverdina de pigmento, por si só, esteja associada a investimento materno dispendioso através das

suas propriedades antioxidantes, devido a possíveis compensações entre investimento reprodutivo e auto-manutenção, conforme discutido por Giordano et al. (2015).

O impacto que as alterações de pigmentação/coloração observadas nas aves expostas a ingestão de água contendo TE pode causar nas populações naturais é desconhecido até o momento. Contudo, estudos prévios evidenciam que ovos amarronzados apresentam maior fertilidade, taxa de eclosão (Kumar et al., 2012) e resistência física (Sekeroglu & Duman, 2011) quando comparados com aqueles de cascas esverdeadas/azuladas. Além disso, mudanças na coloração dos ovos podem afetar a efetividade da estratégia de camuflagem utilizada por muitas aves contra predadores. Conforme demonstrado por Lovel et al. (2013), fêmeas de codornas janonesas pode de fato selecionar o microhabitat que fornece a melhor camuflagem para seu fenótipo particular de ovo durante a reprodução. Em circunstâncias de escassez de recursos para construção de ninhos (e.g: em habitats pouco heterogêneos), mudanças bruscas no padrão de cor dos ovos, pode implicar em insucesso reprodutivo.

Por fim, vale destacar que nosso estudo constitui o primeiro a avaliar de forma mais abrangente os efeitos da ingestão de água contendo TE sobre representantes do grupo das aves, não sendo, portanto, exaustivo. Nesse sentido, é natural que o estudo apresente limitações que devam ser superadas futuramente. A avaliação das fêmeas restringe a observação dos efeitos em apenas um dos sexos; as análises relativas à bioconcentração de elementos químicos do TE nos tecidos dos animais e dos ovos permitiriam o estabelecimento de maior link entre os efeitos observados e os xenobióticos presentes no efluente, assim como análises genotóxicas e/ou mutagênicas mais apuradas contribuiriam enormemente para a compreensão de como esse poluente interfere no funcionamento celular e na expressão de seus genes.

4. Conclusões

Em conclusão, nosso estudo confirma a toxicidade da ingestão do TE por *C. coturnix japonica*, mesmo em pequenas diluições. Enquanto as alterações comportamentais das aves expostas ao poluente demonstram o potencial neurotóxico de seus constituintes, as alterações biométricas, mutagênicas e aquelas relativas aos ovos sugerem que a ação dos componentes químicos não é seletiva, isto é, provavelmente agem de modo mais sistêmico seja sinérgica, antagônica ou aditivamente causando efeitos prejudiciais aos animais. A Tabela 2S apresenta uma síntese dos resultados obtidos em nosso estudo, os quais representam apenas a ponta de um iceberg correspondente à real magnitude do impacto do TE sobre as, haja vista que o presente trabalho é pioneiro em relatar efeitos mais abrangentes em um sistema modelo do grupo das aves.

5. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações do Brasil, pela concessão de auxílio financeiro para a realização deste estudo] e bolsas de estudos aos estudantes coautores. Além disso, agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Ministério da Educação do Brasil, pelo apoio financeiro via bolsas aos estudantes vinculados ao estudo. Por fim, também somos gratos ao Instituto Federal Goiano – especialmente à Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPPi), pela concessão de auxílio tradução concedido.

6. Referências

Aber S.; Salari D.; Parsa M. R. Employing the Taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation–flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*. 127-134. 2010.

Almeida S. F.; Rabelo L. M.; Souza J. M.; Ferreira R. O.; Guimarães A. T. B.; Pereira C. S. O.; Rodrigues A. S. L.; Malafaia G. Behavioral changes in female Swiss mice exposed to tannery effluents. *Revista Ambiente & Água*. 519-534. 2016.

Amaral D. F.; Montalvão M. F.; de Oliveira Mendes B. da Costa Araújo A. P.; de Lima Rodrigues A.; S.; Malafaia G. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. *Environ Sci Pollut Res Int*. 600-616. 2018.

Amaral D. F.; Montalvão M. F.; de Oliveira Mendes B.; da Silva Castro A. L.; Malafaia G. Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environ Sci Pollut Res Int*. 12932-12946. 2018.

Amaral D. F. D.; Montalvão M. F.; Mendes B. O.; de Souza J. M.; Chagas T. Q.; Rodrigues A. S. L.; Malafaia G. Insights about the toxic effects of tannery effluent on *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Sci Total Environmental*. 791-801. 2017.

Anderson K. E.; Tharrington J. B.; Curtis P. A.; Jones F.T. Shell Characteristics of Eggs from Historic Strains of Single Comb White Leghorn Chickens and the Relationship of Egg Shape to Shell Strength. *International Journal of Poultry Science*. 17-19. 2004.

- Baggott, G. K.; Deeming, D. C.; Hemon, S. and Paillat, P. Relationships between eggshell pigmentation, ultrastructure and water vapour conductance in the houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). Avian and poultry Biology Reviews. 234-235. 2002.
- Bårdsen B. J.; Hanssen A. S.; Bustnes J. O. Multiple stressors: modeling the effect of pollution, climate, and predation on viability of a sub-arctic marine bird. Ecosphere. 01-22. 2018.
- Borchelt, P. L., Development of dustbathing components in Bobwhite and Japanese quail. Dev. Psychobiol. 97-103. 1977.
- Borgia V. J. F.; Thatheyus AJ, Murugesan AG, Alexander SCP, Geetha I. Effects of effluent from electroplating industry on the immune response in the freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Fish Shellfish Immunol. 86-92. 2018.
- Brasil, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual Prático de análise de água. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 146-160. 2006.
- Brotons L.; Magrans M.; Ferrús L.; Nadal J. Direct and indirect effects of pollution on the foraging behaviour of forest passerines during the breeding season. Canadian Journal of Zoology. 556-565. 1998.
- Burgers, J.; Opdam, P.; Müskens, G.; Ruiters, E. Residue levels of DDE in eggs of Dutch Sparrowhawks *Accipiter nisus* following the ban on DDE. Environmental Pollution Series B Chemical and Physical. 29-40. 1986.
- Carter T. C.; The hen's egg: Estimation of shell superficial area and egg volume, using measurements of fresh egg weight and shell length and breadth alone or in combination. British Poultry Science. 541-543. 1975.
- Cassey P.; Thomas G. H.; Portugal S. J.; Maurer G.; Hauber M.E., Grim T.; Lovell P.G.; Miksik I. Why are birds' eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds. Biological Journal of the Linnean Society. 657-672. 2012.

Collias E. C. Inheritance of egg-color polymorphism in the village weaver (*Ploceus cucullatus*). *The Auk*. 683-692. 1993.

Currie D.; Valkama J. Limited effects of heavy metal pollution on foraging and breeding success in the curlew (*Numenius arquata*). *Environmental Pollution*. 253-261. 1998.

De-Faria D. B. G.; Montalvão M. F.; Chagas T. Q.; Araújo A. P. C.; Souza J. M.; Mendes B. O.; Rodrigues A. S. L.; Malafaia G. Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. *Sci Total Environ*. 1553-1564. 2018.

de-Oliveira-Crisanto K.; de Andrade W. M.; de Azevedo Silva K. D.; Lima R. H.; de Oliveira Costa M. S.; de Souza Cavalcante J.; de Lima R. R.; do Nascimento E. S. Jr.; Cavalcante J. C. The differential mice response to cat and snake odor. 272-279. 2015.

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

Farghly, M. F. A.; Mahrose, Kh. M. A. and Abou-Kassem, D. E. Pre and post hatch performance of different japanese quail egg colors incubated under photostimulation. *Asian Journal of Poultry Science*. 19-30. 2015.

Fernandes, D. P. B.; Silva, I. J. O.; Nazareno, A. C.; Donofre, A. C.; Sevegnani, K. B. Reconhecimento de cores de objetos e de alimentos de cromaticidades opostas por pinto de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 67,873-881, 2015.

Forkman B.; Boissy A.; Meunier-Salaün M. C.; Canali E.; Jones R. B. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol Behav*. 92, 340-74. 2007.

Gerken, M.; Petersen, J.; Bidirectional selection for dustbathing activity in Japanese quail (*Coturnix coturnixjaponica*). *Brit. Poultry Sci*. 23-37. 1987.

Gillois K.; Lévêque M.; Théodorou V.; Robert H.; Mercier-Bonin M. Mucus: na underestimated gut target for environmental pollutants and food additives. *Microorganisms*. 1-18. 2018.

Giordano M.; Costantini D.; Pick J. L.; Tschirren B. Female oxidative status, egg antioxidant protection and eggshell pigmentation: a supplemental feeding experiment in great tits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 235-346. 2015.

Grace J. K.; Martin-Gousset L.; Angelier F. Delayed effect of early-life corticosterone treatment on adult anti-predator behavior in a common passerine. *Physiology & Behavior*. 82-90. 2017.

Guimarães A. T.; Ferreira R. O.; Rabelo L.M. E.; Silva B. C.; de Souza J. M.; da Silva W. A.; de Menezes I. P.; Rodrigues A. S.; Vaz B. G.; de Oliveira Costa D. R.; Pereira I.; da Silva A. R.; Malafaia G. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents shows object recognition deficits. *Chemosphere*. 593-602. 2016.

Guimarães A. T. B.; de Oliveira Ferreira R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. Memory and depressive effect on male and female Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicol Teratol*. 123-138. 2017 .

Guimarães A. T. B.; de Oliveira Ferreira R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. Memory and depressive effect on male and female Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicol Teratol*. 123-127. 2017.

Guimarães A. T. B.; de Oliveira Ferreira R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. Evaluating the reproductive toxicology of tannery effluent in male Swiss mice. *Science of The Total Environment*, in press. 235-247. 2018.

Hall A. P.; Elcombe C. R.; Foster J. R.; Harada T.; Kaufmann W.; Knippel A.; Huttler K.; Malarkey D. E.; Maronpot R. R.; Nishkawa A.; Nolte T.; Schulte A.; Strauss V.; York M. J. Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes—Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*. 971-994. 2012.

Hallmann C.; Foppen R. P.B.; van-Turnhout C. A. M.; Kroon H.; Jongejans R. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*. 1-12; 2014.

Herberholz J.; Marquart G. D. Decision Making and Behavioral Choice during Predator Avoidance. *Front Neurosci*, 125-141. 2012.

- Idahor, K. O.; Akinola, L. A. F. and Chia, S. S.. Predetermination of quail chick sex using egg indices in North Central Nigeria. *Journal of Animal Production Advances*. 599-605. 2015
- Jagannath A.; Shore R. F.; Walker L. A.; Ferns P. N.; Gosler A. G. Eggshell pigmentation indicates pesticide contamination. *Journal of Applied Ecology*. 133-140. 2008.
- Kamata R.; Takahashi S.; Shimizu A.; Morita M.; Shiraishi F. In ovo exposure quail assay for risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Arch Toxicol*. Dec;80(12):857-867. 2006
- Ketta M.; Tumová E. Eggshell structure, measurements, and quality-affecting factors in laying hens: a review. *Czech J Anim Sci*. 299-309. 2016.
- Kirikci K.; Gunlu A.; Garip M. Some quality characteristics of pheasant (*Phasianus colchicus*) eggs with different shell colors. *Turk J Vet Anim Sci*. 315-318. 2005.
- Li G.; Chen S.; Duan Z.; Qu L.; Xu G.; Yang N. Comparison of protoporphyrin IX content and related gene expression in the tissues of chickens laying brown-shelled eggs. *Poult Sci*. 3120-3124. 2013.
- Lima H. J. D.; Barreto S. L. T.; Paula E.; Dutra D. R.; Costa S. L.; Abjaude W. S. Níveis de sódio na ração de codornas japonesas em postura. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 73-81. 2015.
- Liu Z.; Sun C.; Yan Y.; Li G.; Shi F.; Wu G.; Liu A.; Yang N. Genetic variations for egg quality of chickens at late laying period revealed by genome-wide association study. *Scientific Reports*. 10832. 2018.
- Lovell P. G.; Ruxton G. D.; Langridge K. V.; Spencer K. A. Egg-laying substrate selection for optimal camouflage by quail. *Current Biology*. 260-264. 2013.
- Lunardelli B.; Cabral M. T.; Vieira C. E. D.; Oliveira L. F.; Risso W. E.; Meletti P. C.; Martinez C. B. R. Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology and Environment Safet*. 188-194. 2018.

Lundholm, C. E. DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 113–128. 1997.

Marques A.; Guedes G.; Ferreira F. Leather wastes in the Portuguese footwear industry: new framework according design principles and circular economy. *Procedia Engineering*. 303-308, 2017.

Matsumoto S. T.; Mantovani M. S.; Malagutti M. I. A.; Dias A. L.; Fonseca I. C.; Marin-Morales M. A. 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. *Genet Mol Biol*. 148-158. 2006.

Meluzzi A.; Simoncini F.; Sirri F.; Vandi L.; Giordani G. Feeding hens diets supplemented with heavy metals (chromium, nickel and lead). *Arch Geflügelk*. 119-125. 1996.

Mendes B. O.; Rabelo L. M. E.; Silva B. C.; de Souza J. M.; da Silva Castro A. L.; da Silva A. R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environ Sci Pollut Res Int*. 19234-19248. 2017.

Mendes B. O. 1.; Mesak C.; Calixto J. E. D. Jr.; Malafaia G. Mice exposure to haloxyfop-p-methyl ester at predicted environmentally relevant concentrations leads to anti-predatory response deficit. *Environ Sci Pollut Res Int*. 31762-31770. 2018.

Mesak C.; Sampaio D. M. D. R.; Ferreira R. O.; Mendes B. O.; Rodrigues A. S. L.; Malafaia G. The effects of predicted environmentally relevant concentrations of ZnO nanoparticles on the behavior of *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae) chicks. *Environ Pollut*. 1274-1282. 2018.

Michael J.; Quinn Jr. Avian behavioral toxicity methods for use with the Japanese Quail *Coturnix japonica* as a model species. *Avian Ecol. Behav*. 41–50. 2012.

Mills A. D.; Crawford L. L.; Domjan M., Faure J. M. The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 261-281. 1997.

Montalvão M. F.; da Silva Castro A. L.; de Lima Rodrigues A. S.; de Oliveira Mendes B.; Malafaia G. Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. *Sci Total Environ.* 1595-1606. 2017.

Morales J.; Velando A.; Torres R. Biliverdin-based egg coloration is enhanced by carotenoid supplementation. *Behavioral Ecology and Sociobiology.* 197-203. 2011.

Morales J, Velando A, Moreno J. Pigment allocation to eggs decreases plasma antioxidants in a songbird. *Behav Ecol Sociobiol.* 227-233. 2008.

Morishita T. Y. Can you judge a fecal sample by its color? In *Proc of the Western Poultry Diseases Conference, Sacramento, California.* 567-572. 1994.

Mwinyihija M. Main Pollutants and Environmental Impacts of the Tanning Industry. In: Mwinyihija M. (ed.). *Ecotoxicological Diagnosis in the Tanning Industry.* New York: Springer-Verlag. 145-149. 2010.

Mwinyihija M. Pollution Control and Remediation of the tanning effluent. *The Open Environmental Pollution & Toxicology Journal.* 55-64. 2012.

National Research Council - NRC. Nutrient requirements of poultry. 9.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences. 155. 1994.

Okumus A.; Durmus I.; Egg color genes and its quantitative utilisation in Japanese quail. 10th European Poultry Conf.. 21-26. 1998.

Ortega C. P. Effects of noise pollution on birds: a brief review of knowledge. *Ornithological Monographs*, 74: 6-22, 2012. Rhind SM. Anthropogenic pollutants: a threat to ecosystem sustainability? =3391-3401, 2009.

Okuyama M. Current status of Japanese Quail *Coturnix japonica* as a game Bird. *Journal of the Yamashina Institute for Ornithology*, 35(2): 189-202, 2004.

Pacheco J. W. F. *Curtumes (Série P+L).* São Paulo: CETESB. 35-43. 2005.

Peakall D. Animal biomarkers as pollution indicators. Springer-Science & Business Media. 234-247. 1992.

Rabelo L. M.; Guimarães A. T. B.; de Souza J. M.; da Silva W. A. M.; de Oliveira Mendes B.; de Oliveira Ferreira R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. Histological liver changes in Swiss mice caused by tannery effluent. *Environ Sci Pollut Res Int.* 1943-1949. 2017.

Red List. International Union for Conservation of Nature (IUCN). Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/photos/2016>. Acesso em 24 de mar.de 2017.

Ribeiro C. L. N.; Barreto S. L. T. Reis R. S.; Muniz J. C. L.; Viana G. S.; Ribeiro-Junior V.; Mendonça M. O.; Ferreira R. C.; DeGroot A. A. The Effect of Calcium and Available Phosphorus Levels on Performance, Egg Quality and Bone Characteristics of Japanese Quails at End of the Egg-Production Phase. *Rev Bras Cienc Avic.* 33-40, 2016.

Ribièrè .; Peyret P.; Parisot N.; Darcha C.; Déchelotte P. J.; Barnich N.; Peyretailade E.; Boucher D. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci Rep*, 310-324, 2016.

Romijn C. A. F. M.; Grau R.; Guth J. A.; Harrison E. G.; Jackson C. M.; Lefebvre B.; Street J. R. The use of Japanese and bobwhite quail as indicator species in avian toxicity test. *Chemosphere.* 30, 1033-1040, 1995.

Salzen EA, Lily RE, Mckeown JR. Colour preference and imprinting in domestic chicks. *Anim. Behav.* 542-547, 1971.

Sansom A.; Lind J.; Cresswell W. Individual behavior and survival: the roles of predator avoidance, foraging success, and vigilance. *Behavioral Ecology.* 1168-1174, 2009.

Satterlee D. G.; Marin R. H. Stressor-induced changes in open-field behavior of Japanese quail selected for contrasting adrenocortical responsiveness to immobilization. *Poult Sci.* 404-409, 2006.

Scheuhammer A. M. Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. *Environmental Pollution.*, 329-375. 1991.

Schmid I.; Wechsler B. Behaviour of Japanese quail (*Coturnix japonica*) kept in semi-natural aviaries. *Applied Animal Behaviour Science*.103-112. 1997.

Sefton A. R.; Siegel P. B. Body Wright relationships of newly hatched japanese quail. *Poultry Science*. 1254-1256, 1974.

Sekercioğlu C. H. Daily GC, Ehrlich PR. Ecosystem consequences of bird declines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18042-1847. 2004.

Sekeroglu, A. and Duman, M. Effect of egg shell colour of broiler parent stocks on hatching results, chickens performance, carcass characteristics, internal organ weights and some stress indicators. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*. 837-842. 2011.

SEZER, M.; TEKELIOGLU, O. Quantification of japanese quail eggshell colour by image.Analysis.Biol. Res., v.42, n.1, p. 99 – 105, 2009.

Siqueira I. R.; Vanzella C.; Bianchetti P.; Rodrigues M. A. S.; Stülz S. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: the effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicology and Teratology*. 481-484. 2011.

Soler J. J.; Navarro C.; Pérez Contreras T.; Avilés J. M.; Cuervo J. J. Sexually selected egg coloration in spotless starling. *Am Nat*. 183–194. 2008.

Souza J. M.; Guimarães A. T. B.; Silva W. A. M.; Pereira C. C. O.; Menezes I. P. P.; Malafaia G. Tannery effluent effects on vertebrates: lessons from experimental animals. *International Journal of Current Research*. 39902-39914. 2016.

Souza J. M.; Silva W. A. M.; Mendes B. O.; Guimarães A. T. B.; Rodrigues A. S. L.; Montalvão M. F.; Malafaia G. Inbred mice strain shows neurobehavioral changes when exposed to tannery effluent. *Environmental Science and Pollution Research*. 2035-2046. 2017.

Souza J. M.; Montalvão M. F.; da Silva A. R.; de Lima Rodrigues A. S.; Malafaia G. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere*. 521-533. .2017.

Souza J. M.; Silva W. A. M.; Mendes B. O.; Guimarães A. T. B.; Rodrigues A. S. L.; Montalvão M. F.; da Costa Estrela D.; da Silva A. R.; Malafaia G. Inbred mice strain shows neurobehavioral changes when exposed to tannery effluent. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2035-2046. 2016.

Souza J. M.; Silva W. A. M.; Mendes B. O.; Guimarães A. T. B.; Rodrigues A. S. L.; Montalvão M. F.; Malafaia G. Inbred mice strain shows neurobehavioral changes when exposed to tannery effluent. *Environmental Science and Pollution Research*. 2035-2046. 2017.

Statkiewicz, W. R.; Schein, M. W., Variability and periodicity of dustbathing behavior in Japanese quail (*Coturnix coturnixjaponica*). *Anim. Behav*. 462-467. 1980.

Taylor A.; Sluckin W.; Hewitt R. Changing colour preferences of chicks. *Anim. Behav*. 3-8, 1969.

Westmoreland D.; Kiltie R. A. Egg crypsis and clutch survival in three species of blackbirds (*Icteridae*), *Biol J Linn Soc*. 159-172. 1996

Weldetinsae A.; Dawit M.; Getahun A.; Patil H. S.; Alemayehu E.; Gizaw M.; Abate M.; Abera D. Aneugenicity and clastogenicity in freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to incipient safe concentration of tannery effluent. *Ecotoxicol Environ Saf*. 98-104. 2016.

Wilson P. B. Recent advances in avian egg science: a review. *Poult Sci*. 3747-3754, 2017.

Zehao H.; Na L.; Kaifeng R. M.; Cuiting L.; Zijan W.; Mei M. In vitro Cytotoxicity and Genotoxicity Analysis of Ten Tannery Chemicals Using SOS/umu Tests and High-content in vitro Micronucleus Tests. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 262-270. 2018.

Tabela 1S. Resultados da análise química e microbiológica da água, do efluente de curtume e de suas respectivas diluições (concentrações).

Elementos químicos	Água	TE (100%)	TE (1,4%)	TE (3,1%)	TE (6,5%)	TE(100%)/água	TE(1,4%)/água	TE(3,1%)/água	TE(6,5%)/água
Al (mg/L)	0,2	2,9	0,23	2,87	2,90	14,50	1,14	14,37	14,50
Cl (mg/L)	4,99	9147	96,41	919,19	2290,49	1833,07	19,32	184,21	459,02
Ba (mg/L)	0,1	2,4	0,12	0,33	0,68	24,00	1,23	3,30	6,75
Cd (mg/L)	<0,0005	1,8	0,02	0,18	0,45	3600,00*	36,99*	360,90*	900,75*
Pb (mg/L)	<0,01	0,6	0,02	0,07	0,16	60,00*	1,59*	6,90*	15,75*
Cu (mg/L)	<0,001	2,4	0,02	0,24	0,60	2400,00*	24,99*	240,90*	600,75*
Hg(mg/L)	<0,0001	0,0009	0,00	0,00	0,00	9,00*	1,08*	1,80*	3,00*
Ni (mg/L)	0,02	1,8	0,04	0,20	0,47	90,00	1,89	9,90	23,25
Mg (mg/L)	160,32	184,00	158,90	146,13	124,84	0,11	0,99	0,91	0,78
Na (mg/L)	5,9	158	7,42	21,11	43,93	26,78	1,26	3,58	7,44
Zn (mg/L)	2,5	16,4	2,64	3,89	5,98	6,56	1,06	1,56	2,39
As (mg/L)	0,005	1,4	0,02	0,14	0,35	280,00	3,79	28,90	70,75
Cr (mg/L)	<0,01	479	4,80	47,91	119,76	47900,00*	479,99*	4790,90*	11975,75*
Sn (mg/L)	<0,01	7,200	0,08	0,73	1,81	720,00*	8,19*	72,90*	180,75*
Ag (mg/L)	<0,01	0,400	0,01	0,05	0,11	40,00*	1,39*	4,90*	10,75*
Si (mg/L)	0,2	2,900	0,23	0,47	0,88	14,50	1,14	2,35	4,38
Ca (mg/L)									
P (mg/L)									
Análise microbiológica									
Coliformes totais (UFC/mL)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-	-	-	-

Legenda: TE: tannery effluent. TE/água: relação entre as concentrações de água com aquelas identificadas no efluente de curtume. Os valores são expressos como o número de vezes em que as concentrações dos elementos químicos do TE é maior do que aquelas identificadas na água. (*): indica um valor estimado, pois considerou-se como concentrações dos respectivos elementos químico os limites de quantificação da técnica analítica utilizada no presente estudo. Logo, a relação TE/água pode ser ainda maior.

Table 2S. Informação geral da análise de componentes orgânicos do TE 100%

ESI (+)				
<i>m/z</i> ^a	Error (ppm) ^b	RDB ^c	Molecular Formula	Name
157.0832	4.64	3.5	C ₄ H ₈ N ₆ O	1,1-Dimethyl-3-(2H-tetrazol-5-yl)urea
236.1070	8.3	10.5	C ₁₆ H ₁₃ NO	Methyl-2-phenyl -3-formylindole
304.2999	9.4	3.5	C ₂₁ H ₃₇ N	2-Hexyl-3,5-dipentylpyridine
359.2369	3.9	11.5	C ₂₆ H ₃₀ O	2,6-di(4-isopropylbenzylidene)cyclohexan-1-one
475.3166	1.8	7.5	C ₂₇ H ₄₂ N ₂ O ₅	N-[(E)-[(3E,17β)-17-Hydroxy-17-methylandrosta-4-en-3-ylidene]amino]oxyacetyl]valine
881.7494	0.2	12.5	C ₅₉ H ₉₆ N ₂ O ₃	N ² -[(3β)-Cholest-5-en-3-yl]-N-{11-[(7α,17β)-3,17-dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-7-yl]undecyl}-N-methylglycinamide
ESI (-)				
164.0928	1.1	0.5	C ₆ H ₁₅ NO ₄	(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
232.0800	4.4	4.5	C ₅ H ₁₁ N ₇ O ₄	N-[Bis(2-carbamoylhydrazino)methylene]glycine
283.1875	1.1	-0.5	C ₁₁ H ₂₈ N ₂ O ₆	2-[(3-Aminopropyl)amino]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol - 2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (1:1)
511.3488	-0.9	0.5	C ₂₅ H ₅₂ O ₁₀	22-Hydroperoxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxidotriacontan-1-ol
579.3341	3	17.5	C ₃₆ H ₄₄ N ₄ O ₃	N-{5-[(2-Ethyl-1-piperidinyl)carbonyl]-2-(6-oxo-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0 _{2,7}]-trideca-2,4-dien-11-yl)phenyl}-4-(2-methyl-2-propanyl)benzamide

^a"m/z" apresenta a massa dividida pelo número de carga e o eixo horizontal no espectro de massa é expresso em unidades de m / z.

^b"Error (ppm)" representa o erro de massa de uma tarefa, ao comparar uma m / z teórica e uma m / z observada experimentalmente.

^cRDB – ring/double bond equivalente. Os íons foram detectados como [M - H] - protonado [H + H] + e aducto [M + Na] + e [M-S] -

Tabela 3S. Síntese dos resultados obtidos no presente estudo, com identificação de aumento (↑), diminuição (↓) ou nenhuma alteração (-) nos parâmetros avaliados em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes diluições de efluente de curtume.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	TE(1.4%)	TE(3.1%)	TE(6.5%)
Latência para a primeira locomoção	–	–	–	–
Total de cruzamentos de quadrantes	–	–	–	–
Tempo de congelamento	↑	↓	↓	↓
Frequência de congelamento	↑	↓	↓	↓
Tempo de congelamento	↓	–	–	–
Frequência de congelamento	↓	–	–	–
Frequência de alta postura	↑	–	–	–
Frequência de ciscagem	↓	–	–	–
Tempo de exploração de larvas de <i>T. molitor</i> comparado com larvas falsas	↑	–	–	–
Frequência de bicadas de larvas de <i>T. molitor</i> comparado com larvas falsas	↑	–	↓	–
Latência para comer as larvas de <i>T. molitor</i>	↓	–	↑	–
Índice de predação	↑	↓	↓	↓

PB test: Teste de comportamento predatório; OP test: Open field test (Teste campo aberto); Teste de reconhecimento de objetos: OR test. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

Tabela 3S. Continuação.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	TE(1.4%)	TE(3.1%)	TE(6.5%)
Total de cruzamentos de quadrantes na presença do gato	↑	–	–	–
Tempo de permanência na zona aversiva, na presença do gato	↓	–	–	–
Tempo de permanência na zona de segurança, na presença do gato	↑	–	–	–
Total de cruzamentos de quadrantes na presença da cobra	–	–	–	–
Tempo de permanência na zona aversiva, na presença da cobra	↓	↓	–	–
Tempo de permanência na zona de segurança, na presença da cobra	–	–	–	–
Total de anormalidades nucleares eritrocitárias (MN assay)	↓	↑	↑	↑
Produção de ovos	↑	↓	↓	↓
Biomassa dos ovos produzidos	↑	↓	↓	↓
Espessura da casca dos ovos produzidos	↑	↓	↓	↓
Área superficial da casca	–	–	–	–

RDAP test: Teste de resposta defensiva antipredatória. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

Tabela 3S. *Continuação.*

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	TE(1.4%)	TE(3.1%)	TE(6.5%)
Volume dos ovos produzidos	—	—	—	—
Índice de forma dos ovos produzidos	—	—	—	—
Índice de conversão alimentar	↓	↑	↑	↑
Índice de eficiência alimentar	↑	↓	↓	↓
Biomassa corpórea (inicial vs. final)	↓	↓	↓	↓
Biomassa relativa do fígado	↓	↑	↑	↑
Biomassa relativa do cérebro	—	—	—	—
Consumo de ração	↓	↑	↑	↑
Consumo de água	—	—	—	—
Variação fenotípica da coloração dos ovos produzidos	↑	↓	↓	↓

C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).

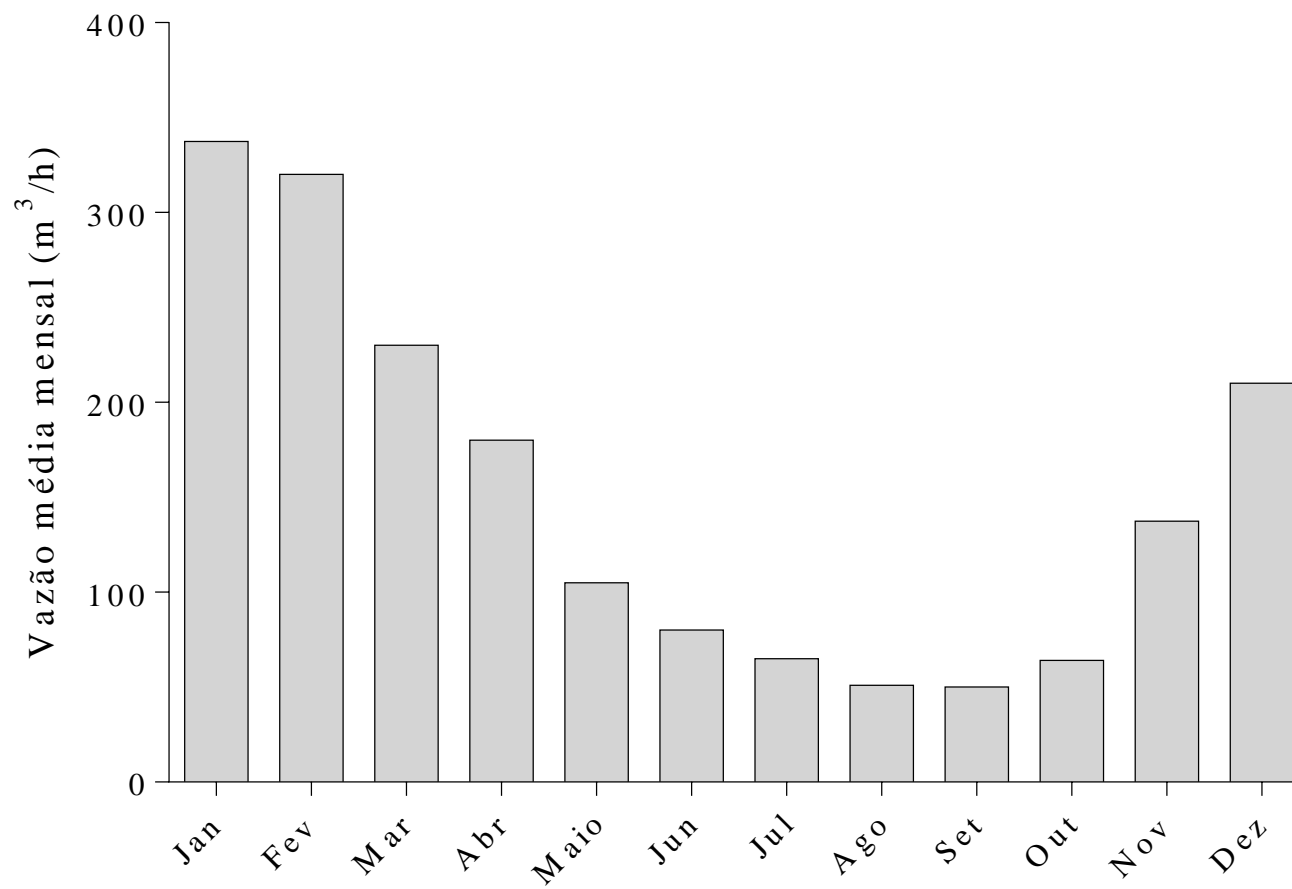


Figura 1S. Vazão média anual do curso d'água situado próximo à empresa de curtume concedente do efluente utilizado no presente estudo. Por razões éticas, a localização geográfica e o nome do curso d'água serão omitidos.

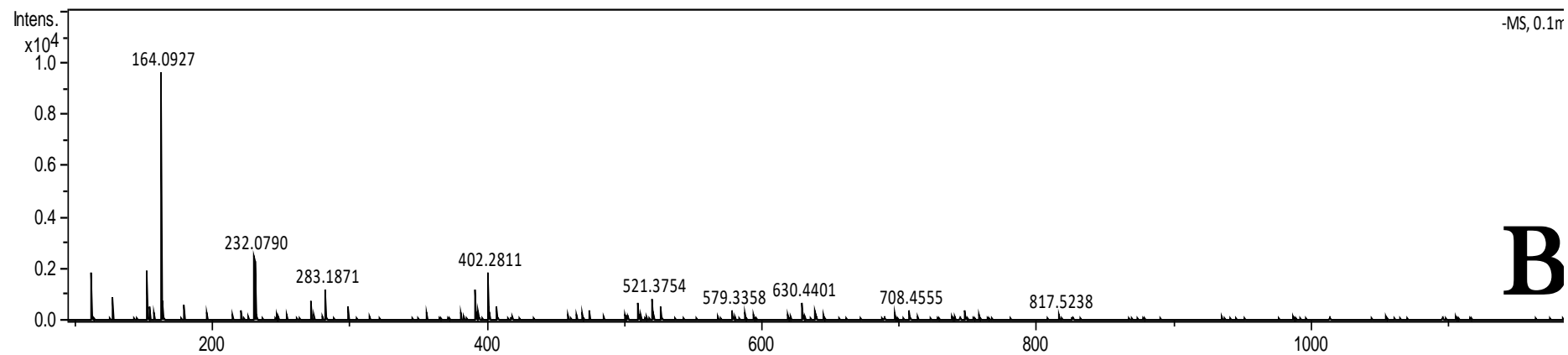
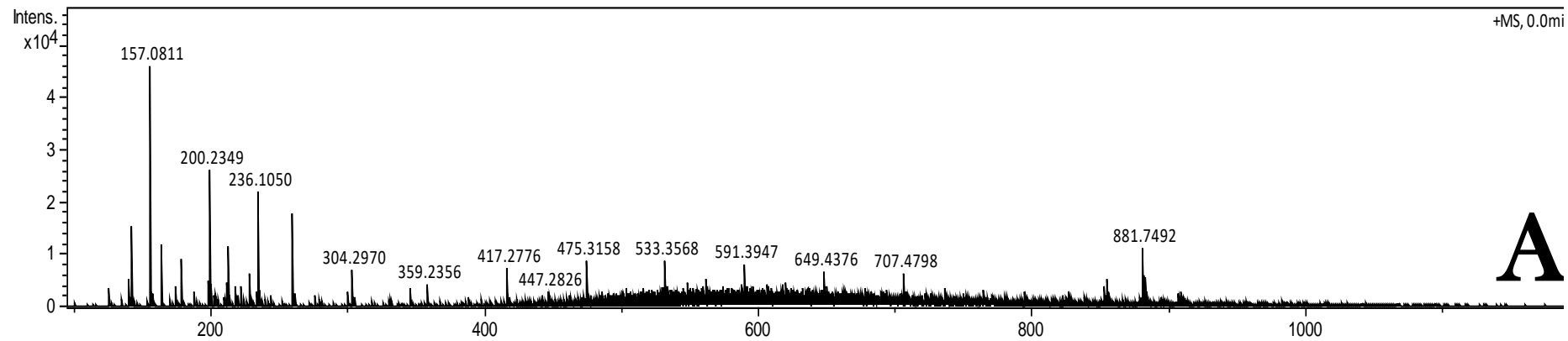


Figure 2S. Espectro de massa de efluente de curtume bruto por Ionização por Electrospray (+) Orbitrap MS e (B) Ionização por Electrospray (-) Orbitrap MS..

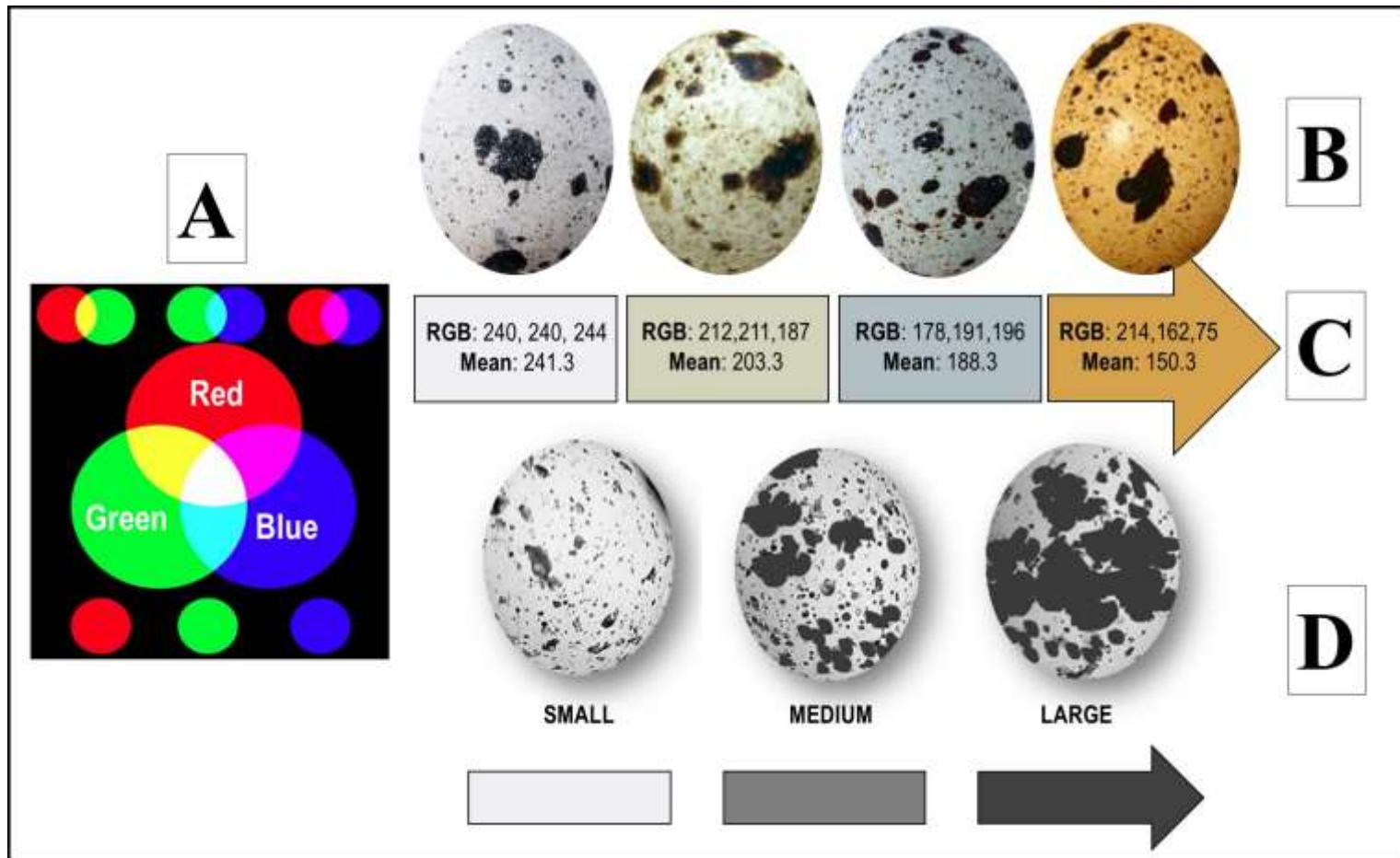


Figura 3S. (A) Desenho esquemático representativo do modelo RGB de cores; (B-C) variação da tonalidade das cores de fundo dos ovos; (D) variação da quantidade de manchas e tonalidade da casca dos ovos. A variação de cores foi categorizada a partir do software ColorPix v.1.1.

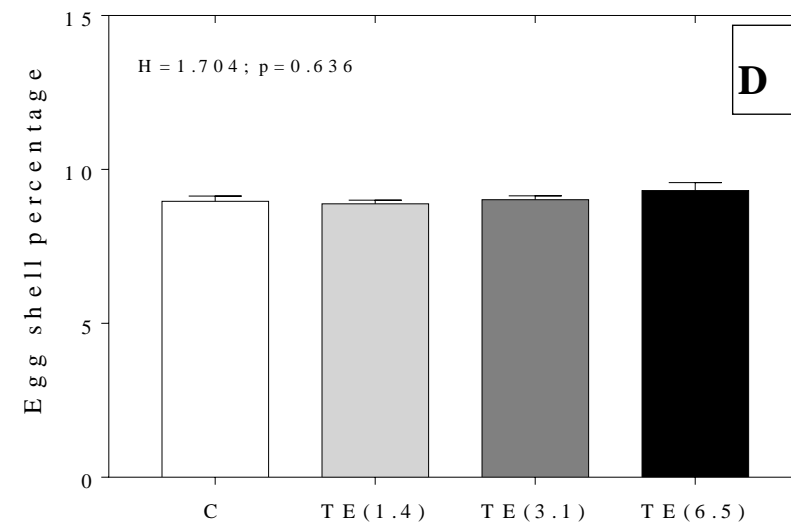
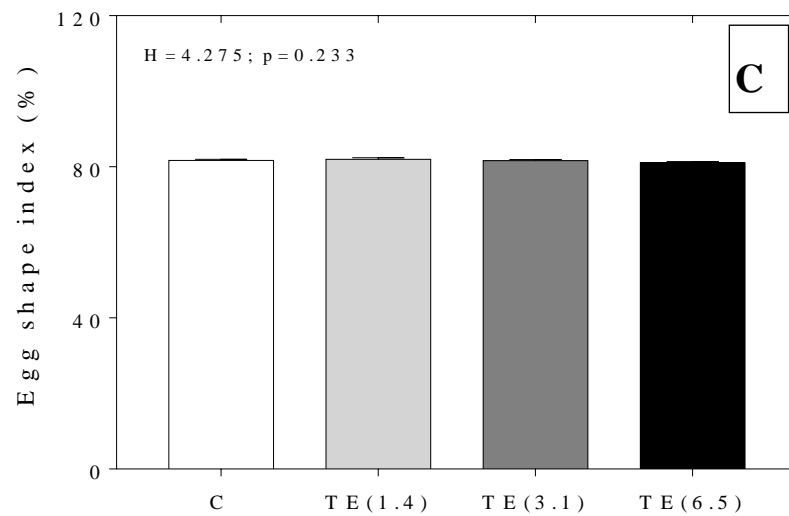
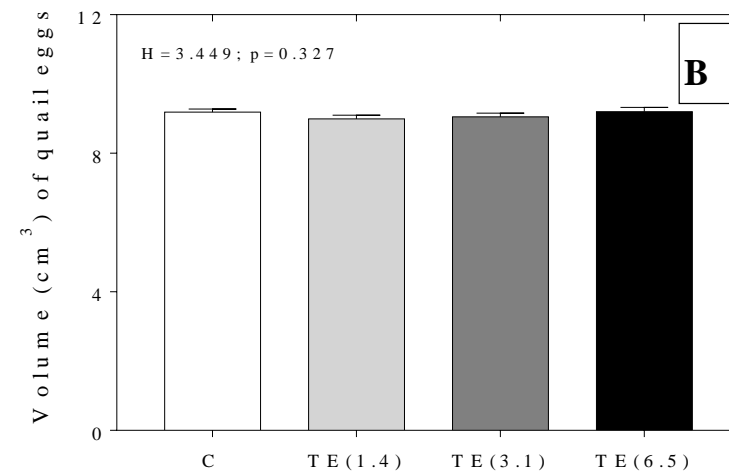
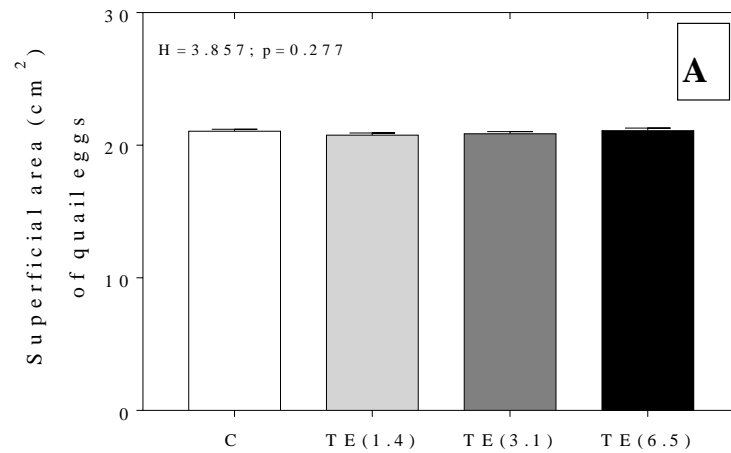


Figura 4S. (A) Área superficial, (B) volume; (C) índice de forma e (S) percentual de casca dos ovos produzidos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ou não a diferentes concentrações de efluente de curtume. As barras indicam a erro + desvio padrão e as letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: controle; TE: grupos expostos a tannery effluent diluídos a 1.4% [TE(1.4)], 3.1% [TE(3.1)] e 6.5% [TE(6.5)] (n=12/cada).



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Campus
Urutaí

