



MONITORAMENTO AMBIENTAL DO Cr (VI) ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE GLICOGÊNIO NO BIOINDICADOR DANIO RERIO

Rosângela Moraes de Mello - rosangela.mello@ymail.com Centro Universitário La Salle - UNILASALLE
Rua Euclides da Cunha, 222
95780-000 – Montenegro – RS

Jéssica Nastácia Pires Kurtz - jessicakurtz@bol.com.br Centro Universitário La Salle - UNILASALLE

Tássia Michele Huff Tietböhl - tassiahuff@msn.com Centro Universitário La Salle - UNILASALLE

Francine Balbinot - balbinot.fran@hotmail.com Centro Universitário La Salle - UNILASALLE

Alessandra Marqueze - alessandra@unilasalle.edu.br Centro Universitário La Salle - UNILASALLE

Resumo: A contaminação ambiental é um problema mundial que vem aumentando em larga escala, onde a poluição dos recursos hídricos afeta significativamente a disponibilidade da água e acarreta os mais diversos problemas para os ecossistemas aquáticos, onde os efeitos se propagarão através dos demais componentes dos ecossistemas causando modificações em suas populações e comunidades, alterando os processos de fluxo de nutrientes, respiração e fotossíntese. Neste sentido foi realizado estudo referente ao monitoramento de águas contaminadas com diferentes concentrações de cromo hexavalente (CrVI) através do uso do bioindicador ambiental *D. rerio* por meio das alterações nas reservas de glicogênio, que é utilizado como indicador de desequilíbrio interno do organismo frente a contaminação ambiental. Inicialmente foram realizados ensaios de exposição aguda por um período de 48 horas utilizando diferentes concentrações (20, 30 e 40 mg/L⁻¹) de Cr(VI). Ao término da exposição aguda os peixes foram capturados e crioadestesiados para posterior análise bioquímica. O parâmetro bioquímico analisado foi o glicogênio sendo quantificado como glicose. Foi possível verificar que os parâmetros da água e os valores de Cr(VI) mantiveram-se estáveis durante a realização dos ensaios, não interferindo na condição de sobrevivência dos peixes. Diante dos resultados encontrados neste estudo através das análises bioquímicas das diferentes concentrações de Cr(VI) observa-se uma mobilização nas reservas de glicogênio, entretanto esta redução não foi significativa ($p < 0.05$) no período de exposição aguda (48h).

Palavras-chave: Cromo, *Danio rerio*, glicogênio



MONITORAMENTO AMBIENTAL DO Cr (VI) ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE GLICOGÊNIO NO BIOINDICADOR DANIO RERIO

Abstract: Environmental contamination is a global problem that is increasing in scale, where pollution of water resources significantly affects the availability of water and causes the most diverse problems to aquatic ecosystems, where the effects will propagate through the other components of ecosystems causing changes in their populations and communities, changing the nutrient flow processes, respiration and photosynthesis. In this sense the study was conducted regarding the monitoring of waters contaminated with different concentrations of hexavalent chromium (CrVI) through the use of environmental bioindicator *D. rerio* through changes in glycogen stores, which is used as an internal imbalance indicator of the organism to environmental contamination. Initially acute exposure experiments were performed for 48 hours using different concentrations (20, 30 and 40 mg/L⁻¹) Cr (VI). At the end of acute exposure the fish were caught and cryoanesthetized for further biochemical analysis. The analyzed biochemical parameter was glycogen being quantified as glucose. It was possible to verify that the water parameters and values of Cr (VI) remained stable during the tests, not interfering in fish survival condition. Given the results of this study Biochemical analyzes of different concentrations of Cr (VI) is observed mobilization in glycogen stores, however this reduction was not significant ($p < 0.05$) in acute exposure period (48 hours).

Keywords: chromium, *Danio rerio*, glycogen

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental é um problema mundial que vem aumentando em larga escala nos últimos anos. Teve início com a Revolução Industrial no ano de 1760 e se intensificou com a Revolução Verde, a partir de 1960, alavancada pelo movimento pós-guerra.

Onde a poluição dos recursos hídricos afeta significativamente a disponibilidade da água de boa qualidade e acarreta os mais diversos problemas para os ecossistemas aquáticos e a saúde humana. De acordo com Pereira *et al.*, (2004), as atividades domésticas, comerciais e industriais geram problemas característicos que implicarão de forma determinada na qualidade do corpo receptor.

Deste modo, a principal via de transporte de materiais resultantes dos processos antrópicos e naturais são os rios e estuários, estabelecendo a conexão entre continente e oceano (CARVALHO *et al.* 2002, MONBET, 2004). Com isso, importantes transformações vêm acontecendo nessas regiões, pois são suscetíveis à contaminação direta (através da urbanização, atividade portuária e industrial) e à indireta, por deposição atmosférica e/ou através do aporte de rios que drenam localidades urbanizadas onde portos e/ou indústrias foram implantados (FRANZ, 2004).

Portanto, os processos de contaminação antropogênicos são os principais responsáveis pela presença de cromo em águas naturais. Estes processos são oriundos de indústrias de transformação e beneficiamento de metal, do tratamento de madeira, curtumes, mineração, indústrias de manufaturas de pigmentos, filmes fotográficos e de inibidores de corrosão. Contudo, a ocorrência natural de cromo (VI) está associada a incêndios florestais e erupções vulcânicas (SILVA & PEDROZO, 2001).

É importante salientar que, segundo Mendes (2004), quando um organismo entra em contato com algum poluente, que esteja no meio ambiente, o mesmo pode apresentar alterações decorrentes dessa exposição. Entre elas estão os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Esses efeitos se propagarão através dos demais componentes dos ecossistemas causando modificações em suas populações e comunidades, alterando os processos de fluxo de nutrientes, respiração e fotossíntese (CONNELL & MILLER, 1984).

Desta forma, no monitoramento aquático, os peixes atuam como bons indicadores de poluição. Por serem consumidores secundários e pertencerem ao nível superior do ecossistema aquático, estes animais acumulam grandes quantidades de substâncias persistentes (MOLLERKE *et al.*, 2003).



As reservas de carboidratos (glicose, glicogênio e lactato) podem estar alteradas no tecido e no sangue (LERMEN *et al.*, 2004; BEGUM *et al.*, 1999) e por este motivo são utilizadas com frequência como indicadores de estresse fisiológico em peixes. Segundo Barbazuk *et al.* (2000), quando comparados em sequência genética, a espécie *Danio rerio* apresenta alto grau de similaridade com genes de humanos e camundongos.

Assim, podemos dizer que a contaminação do meio ambiente é uma consequência do desenvolvimento e crescimento dos países refletindo em um problema que abrange o mundo todo. Entretanto, precisamos pensar em estratégias que venham minimizar estes impactos ambientais, levando a uma melhora na qualidade ambiental, como no auxílio a criação de legislações que estabeleçam níveis menores de poluição. Assim, este trabalho propõe o monitoramento de águas contaminadas com diferentes concentrações de Cromo (VI) através do uso do bioindicador ambiental *D. rerio*.

2. CROMO HEXAVALENTE

O cromo é um mineral traço que ocorre nas valências de -2 a +6, sendo as mais comuns o cromo (II), cromo (III) e cromo (VI) (CHEIS, 2013). De acordo com o estado de oxidação, as funções bioquímicas do cromo podem variar. O cromo hexavalente (Cr^{6+}) é tóxico por ser carcinogênico, enquanto o cromo trivalente (Cr^{3+}) é considerado um nutriente essencial para os seres humanos (MANZOORI *et al.*, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o limite para o consumo humano, de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de cromo (VI). No entanto, não há estudos científicos que comprovem qual o nível de cromo ingerido que pode causar câncer. Os potenciais efeitos do cromo (VI) variam, principalmente, com as espécies e as quantidades absorvidas na corrente sanguínea, a rota e a duração da exposição. O elemento integra a listagem da EPA (Agência Ambiental dos EUA) dos 129 poluentes mais críticos (CHEIS, 2013).

De acordo com a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) e ABNT 14725-2, o cromo VI segue a classificação de toxicidade descrita na tabela 1.

Tabela 1 - classificação de toxicidade do cromo VI Fonte: FISPQ

| | |
|---|---|
| Sólido oxidante | Categoria 2 (500 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Toxicidade aguda – Oral | Categoria 3(2500 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Toxicidade aguda – Inalação | Categoria 2 (500 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Toxicidade aguda – Dérmico | Categoria 3(5000 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Corrosivo para a pele | Categoria 1B (tempo de exposição de 3minutos a 1hora) |
| Sensibilização respiratória | Categoria 1 (100 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Sensibilização à pele | Categoria 1 (100 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Mutagenicidade em células germinativas | Categoria 1B (tempo de exposição de 3minutos a 1hora) |
| Carcinogenicidade | Categoria 1B (tempo de exposição de 3minutos a 1hora) |
| Toxicidade à reprodução | Categoria 1B (tempo de exposição de 3minutos a 1hora) |
| Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única, Sistema respiratório | Categoria 3(2500 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição repetida | Categoria 1 (100 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Perigoso ao ambiente aquático – Agudo | Categoria 1 (100 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |
| Perigoso ao ambiente aquático – Crônico | Categoria 1 (100 $\mu\text{L/L}$ (ppm)) |

A disponibilidade das espécies de cromo (III ou VI) nas águas naturais é controlada pelas características físico-químicas dos sistemas aquáticos. Em ambientes aquáticos redutores com acidez elevada, a espécie predominante é a trivalente. Assim sendo, a espécie predominante em ambientes oxidantes e alcalinos é a hexavalente (XING & BEAUCHEMIN, 2010). A acumulação do cromo acontece nas espécies aquáticas por difusão passiva, ou seja, o cromo é acumulado por sua passagem natural através da membrana plasmática. Nesse processo estão envolvidos fatores ecológicos no ambiente abiótico e biótico, onde a acumulação pode ser afetada pelo estado fisiológico e a atividade dos peixes (WHO, 1988). O cromo (VI) tem uma baixa interação com macromoléculas e com isso tem uma pequena atividade biológica. No entanto, em condições fisiológicas, o transporte através das membranas ocorre facilmente como resultado da atividade de transportes inespecíficos de fosfato ou sulfato (ARSLAM *et al.*, 1987, BUTTNER & BEYERSMANN, 1985).

Ao entrar no metabolismo, o cromo se une com um componente proteico, o qual é chamado de apocromodulina. Quando a insulina é liberada no organismo, o cromo é trazido por transportador proteico, chamado transferrina, que transporta o íon ferro também. O cromo é levado pela transferrina até a membrana da célula e em contato com pH ácido, o metal se desprende do transportador e entra na célula, ligando-se à apocromodulina (PIRES, 2010). Inicialmente, esse processo foi chamado de “substância ligadora de cromo de baixo peso molecular”, nos anos 1980. Hoje é conhecido como cromodulina (GOMES *et al.*, 2005).

3. LEGISLAÇÃO

O limite de cromo em corpos hídricos é determinado pela resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) no âmbito nacional. Esse limite é de 0,05 mg L⁻¹ de cromo total para água doce, e de 1,1 mg L⁻¹ de cromo total para águas salinas e salobras. Essa resolução é alterada e complementada pela resolução 410/2009 e posteriormente, pela resolução 430/2011, porém as mesmas não estabelecem limites para cromo hexavalente.

A Resolução 128/2006 do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (CONSEMA), estabelece o limite de 0,1mgL⁻¹ de cromo hexavalente e 0,5mg L⁻¹ de cromo total para efluentes líquidos de fontes poluidoras.

4. DANIO RERIO COMO BIOINDICADOR

Os peixes são os principais representantes dos consumidores secundários nas cadeias tróficas (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990), portanto algumas espécies são utilizadas como bioindicadoras. Entre elas está a *Danio rerio* (Figura 1), chamada popularmente de peixe zebra ou paulistinha, o qual é um actinopterygio, ovíparo, onívoro, cypriniforme da família Cyprinidae, oriundo dos rios e córregos da Índia. Sua distribuição geográfica concentra-se em Índia, Bangladesh, Paquistão, Nepal e Myanmar. *Danio rerio*

Figura 1- *Danio rerio*. Fonte: Arkive.





Segundo Dammski *et al.* (2011), as alterações de pH que esta espécie suporta na natureza, são da faixa de 5.9 – 8.5, possuindo comprimento médio de 3 à 5cm, considerados consumidores secundários na cadeia trófica aquática (ABNT NBR 15088:2011).

A facilidade de reprodução, manejo e manutenção deste bioindicador, assim como os métodos laboratoriais para sua criação, estão bem descritos na literatura (WESTERFIELD, 1994). A utilização desta espécie está associada ao seu tamanho, criação e rápido desenvolvimento, reduzindo os custos de criação e o espaço de manipulação. *Danio rerio* requer pequenas quantidades de soluções experimentais, minimizando os produtos químicos e material de laboratório, utilizados para a realização de ensaios com reagentes e avaliações histológicas, ou para a manutenção dos peixes vivos (HILL *et al.*, 2002).

É recomendável a utilização de espécies cujo comportamento, fisiologia e genética sejam bem conhecidos, de modo a facilitar a interpretação dos resultados (OLIVI *et al.*, 2008). Um bom bioindicador deve possuir características como uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, elevada disponibilidade e abundância, seletividade constante e elevada a poluentes, facilidade de cultivo e adaptação às condições de laboratório, e por fim, ampla distribuição e importância comercial (RAND *et al.*, 1995; RONCO *et al.*, 2004).

A similaridade genética entre *D. rerio* e os humanos, justifica seu uso como bioindicador. De acordo com Barabaran *et al.*, (2005), sistemas de neurotransmissão foram identificados nessa espécie e seu genoma é muito similar ao de mamíferos, incluindo a espécie humana.

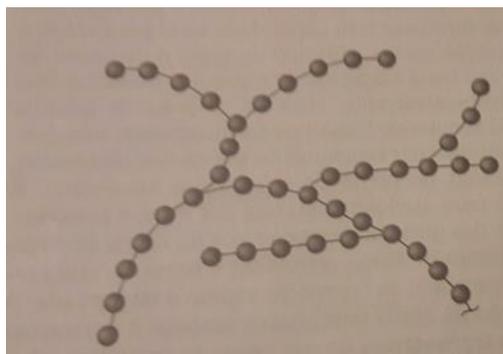
Como exemplo da utilização deste bioindicador, podemos citar o trabalho de Nakagome *et al.* (2007), onde *Danio rerio* apresentou maior sensibilidade aos herbicidas oxifluorfem, oxadiazona e clomazona. O uso conjugado de agroquímicos, uma prática comum na agricultura, pode alterar sua toxicidade, mesmo para produtos com baixo risco ecológico.

5. GLICOGÊNIO

Conforme várias pesquisas já existentes, foram constatados que como resposta a exposição aos contaminantes, os peixes apresentam alterações fisiológicas para se manter em homeostase, sendo assim, as alterações de parâmetros bioquímicos, em específico metabolismo de carboidrato, são bons indicadores dessas alterações. Diante dessa constatação, como forma de se adaptarem ao meio adverso necessitam utilizar energia, muitas vezes tendo que mobilizar as reservas de glicogênio. Bidinotto *et al.* (1997) sugerem que frente a esse estresse ambiental, os peixes como forma de se adaptarem, utilizam a sua reserva de glicose (fonte de energia) em glicogênio para ser rapidamente utilizado. Assim, as alterações de parâmetros bioquímicos podem ser utilizados como indicadores gerais de estresse fisiológico em peixes. Dentre esses, podemos citar o metabolismo de carboidratos, como o glicogênio (BEGUN *et al.*, 1999).

O glicogênio é a forma de armazenamento de glicose em tecidos animais, sendo o glicogênio endógeno sintetizado e armazenado em nossos tecidos, diferente do glicogênio exógeno que se obtém por alimentação (DEVLIN, 2007). Quando a demanda de glicose no sangue está demasiada, o fígado remove da corrente sanguínea e estoca. Necessitando de energia, por estar com baixos níveis de glicose no sangue, o fígado fornece este estoque, quebrando o glicogênio em glicose, através da glicogenólise.

Figura 2 - Estrutura ramificada do glicogênio. Forma de armazenamento de combustível energético (DEVLIN, 2007).



Porém, o glicogênio é estocado em músculo e fígado por razões diferentes. No músculo é uma reserva de combustível para produção de ATP dentro daquele tecido armazenado e já no fígado é uma reserva de glicose para a corrente sanguínea (DEVLIN, 2007). Deste modo, segundo este mesmo autor, a reserva de glicogênio como um combustível de reserva é mais eficiente quando comparado a gordura, por três motivos: tem uma mobilização mais rápida; por ser usada como fonte de energia quando ausente o oxigênio; gordura não pode ser convertida em glicose, não conseguindo manter os níveis de glicose no sangue. Diante disso, as alterações nos níveis de glicose podem estar altas ou baixas, dependendo da espécie e concentração do contaminante em estudo (SUAREZ, 1987, BALBINOT, 2015). Assim, a alteração nas reservas de glicogênio pode ser usada como um indicador de desequilíbrio interno do organismo frente a uma contaminação ambiental.

6. MATERIAL E MÉTODOS

A população de peixes estudados (*D. rerio*) foi adquirida a partir de um fornecedor comercial (Delphis), localizado no município de Porto Alegre, RS.

A contaminação das águas e as análises foram realizadas no mês de março, sendo realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal do Centro Universitário La Salle - Unilasalle, no município de Canoas, RS.

A determinação de cromo hexavalente na água dos aquários foi realizada utilizando método colorimétrico por Difenilcarbazida estabelecido por *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2012).

O monitoramento do cloro total e amônia tóxica foi feito através de kits colorimétricos das marcas Netuno e Alcon, respectivamente. Para obtenção dos valores de dureza total utilizou-se o método titulométrico por EDTA. Após a realização dos ensaios, a água dos aquários foi coletada e o descarte realizado por empresa especializada.

6.1. Delineamento experimental

Para o desenvolvimento da metodologia foram utilizados aquários de vidro nas medidas de 30x30x30, bombas de oxigenação sem carvão ativado, para prevenir uma possível adsorção do contaminante, rede de captura tipo puçá e vidrarias de uso geral. Os instrumentos usados para a realização das análises foram balança analítica (Bel Engineering, Mark 210A.), banho-maria (Biopar, BMD01), termômetros, agitador vortex (Biomixer, QL-901), centrífuga (Fanem, 206-BL), espectrofotômetro de absorção molecular na região do visível (Femto, 700 plus), pHmetro (Kasvi, K39-0014P) e máquina de gelo (Hexicrio).

Os estudos de ecotoxicidade foram realizados seguindo as orientações recomendadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15088 (ABNT, 2011) para estudos de ecotoxicologia aquática pelo método de ensaio com peixes, onde *D. rerio* foi submetido a uma exposição aguda (48 horas) ao contaminante cromo hexavalente.



Os peixes foram dispostos em aquários onde foi mantida uma relação entre a massa dos organismos e volume de água do recipiente de, no máximo, 1g de organismo por litro de água, por um período de 12 horas de luz, sendo, durante os estudos, alimentados uma vez ao dia com ração da marca Alcon Basic. Os indivíduos foram, inicialmente, acondicionados em um aquário com água de abastecimento por um período de sete dias antes do ensaio, para aclimação, a fim de eliminar possíveis organismos inaptos que pudessem interferir nos resultados. Após esse tratamento preliminar, os peixes foram transferidos e distribuídos em quatro unidades experimentais com 20 litros de água de abastecimento, deixados em repouso por 72 horas antes do experimento para aclimação, a fim de evitar o estresse.

A primeira unidade foi designada como grupo controle (CTR), cuja qual recebeu alimentação e ficou sem a presença do contaminante. As concentrações de cromo hexavalente preparadas para os estudos foram de 20 mg.L⁻¹ (T1), 30 mg.L⁻¹ (T2) e 40 mg.L⁻¹ (T3). Todos os tratamentos eram compostos por oito indivíduos, exceto o controle, que era composto por seis.

Após o término do período de exposição aguda ao contaminante, os peixes foram capturados com rede e crioadestesiados (WILSON *et al.*, 2009). O material ficou preservado sob congelamento em equipamento refrigerado a uma temperatura aproximada de -18°C, para posterior análise bioquímica.

6.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em duplicata e utilizaram-se todos os indivíduos de cada tratamento. Os peixes foram pesados (0,200g. a 0,300g.) e após foi feito o processamento do tecido para ser utilizado nas análises bioquímicas.

Para a determinação do glicogênio foi utilizado o método de Van Handel (1965) e sua quantificação foi feita como glicose, após hidrólise ácida e neutralização. A glicose foi determinada por meio do kit de glicose, referência 133 da marca Labtest Diagnóstica S.A.

6.3 Monitoramento dos parâmetros da água de diluição

O monitoramento dos parâmetros foi realizado para garantir a sobrevivência dos peixes nos aquários e verificar para que não houvesse interferência dos parâmetros fisiológicos na água. A temperatura, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram acompanhados uma vez ao dia, durante todo período de contaminação. Todos estes parâmetros, juntamente com dureza, cloro total e amônia tóxica foram mensurados na água de abastecimento utilizada, de acordo com as recomendações estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15088 (ABNT, 2011) para estudos de ecotoxicologia aquática pelo método de ensaio com peixes.

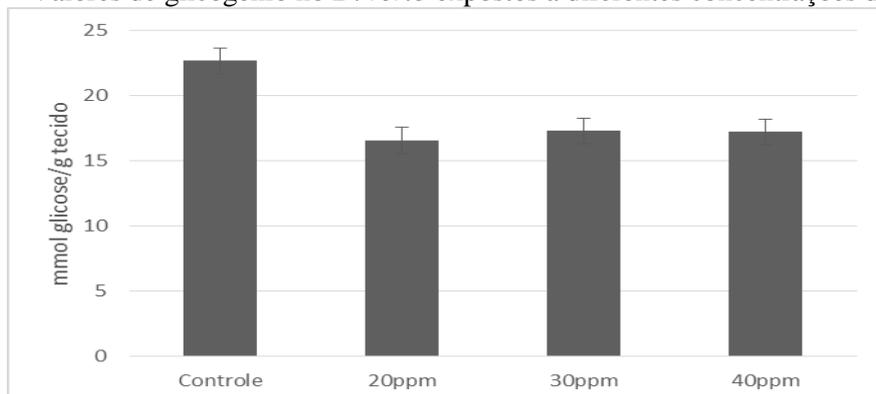
6.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de Dunnet com nível de significância ($p < 0,05$) através do programa Graph Pad InStat 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3 podemos observar que as diferentes concentrações de Cr (VI) promoveram uma mobilização nas reservas de glicogênio em relação ao grupo controle no *Danio rerio*, entretanto, esta redução não foi significativa ($p < 0,05$), conforme a figura 3. No gráfico, as concentrações são expressas em ppm, que equivale a mesma concentração nominal em mg.L⁻¹.

Figura 3 - Valores de glicogênio no *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI)



É possível verificar na tabela 2 que os valores de cromo hexavalente se mantiveram estáveis durante a realização dos ensaios, não sofrendo nenhum tipo de degradação.

Tabela 2 - Concentração de Cr (VI) em diferentes períodos de monitoramento, de acordo com os respectivos tratamentos.

| Tratamentos | Concentração nominal | Após contaminação | 24 Horas | 48 Horas |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| CTR | - | - | - | - |
| T1 | 20 mg.L ⁻¹ | 20 mg.L ⁻¹ | 20 mg.L ⁻¹ | 20 mg.L ⁻¹ |
| T2 | 30 mg.L ⁻¹ | 31 mg.L ⁻¹ | 30 mg.L ⁻¹ | 30 mg.L ⁻¹ |
| T3 | 40 mg.L ⁻¹ | 41 mg.L ⁻¹ | 40 mg.L ⁻¹ | 41 mg.L ⁻¹ |

Os valores maiores do que a concentração nominal são decorrentes da incerteza do método.

A temperatura dos aquários permaneceu entre 23°C e 26°C, de acordo com o recomendado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15088 (ABNT, 2011), assim como o OD manteve-se acima de 5 mg.L⁻¹ e os valores de pH sempre acima de 7, como estabelece a mesma norma. Quando os valores de pH encontravam-se abaixo do ideal, os mesmos eram corrigidos com solução de NaOH 1N.

A dureza total variou de 43 a 46 mg CaCO₃.L⁻¹ e os valores para amônia tóxica (tabela 3) encontraram-se baixos, não interferindo na condição de sobrevivência dos peixes.

Tabela 3 - Concentração de amônia tóxica encontrada durante os ensaios.

| Tratamentos | Após contaminação | 24 Horas | 48 Horas |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CTR | 0,001 mg.L ⁻¹ | 0,002 mg.L ⁻¹ | 0,006 mg.L ⁻¹ |
| T1 | 0,004 mg.L ⁻¹ | 0,005 mg.L ⁻¹ | 0,004 mg.L ⁻¹ |
| T2 | 0,004 mg.L ⁻¹ | 0,009 mg.L ⁻¹ | 0,007 mg.L ⁻¹ |
| T3 | 0,007 mg.L ⁻¹ | 0,016 mg.L ⁻¹ | 0,007 mg.L ⁻¹ |



Tabela 4 - Concentração de cloro total encontrada durante os ensaios.

| Tratamentos | Antes da contaminação | No dia da contaminação | 24 Horas | 48 Horas |
|-------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| CTR | 0 mg.L ⁻¹ | 0 mg.L ⁻¹ | 0 mg.L ⁻¹ | 0 mg.L ⁻¹ |
| T1 | 0 mg.L ⁻¹ | 1 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ |
| T2 | 0 mg.L ⁻¹ | 1 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ |
| T3 | 0 mg.L ⁻¹ | 1 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ | 2 mg.L ⁻¹ |

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

São de extrema importância estudos de ecotoxicidade para que possam ser elucidados os fatos acerca dos problemas oriundos da contaminação ambiental, principalmente ao que se refere a poluição hídrica.

A escolha do bioindicador é de grande importância para que se garanta um resultado confiável, e que a espécie escolhida possua fácil manejo, custo acessível, além de que possa ser eutanasiada de forma que garanta o mínimo de desconforto para a mesma. Mesmo as concentrações estudadas de Cr (VI) sendo 200, 300 e 400 vezes, respectivamente, maiores do que estabelece a Resolução do 128 do CONSEMA (0,1mgL⁻¹ de cromo hexavalente), não promoveram alteração significativa das reservas de glicogênio no período de 48 horas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN Public Health Association. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. 22 ed. Washington: APHA, 2012.

ARSLAM, J.L.; BELTRAME, M.; TOMASI, A. Intracellular chromium reduction. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando, v.931, n.1, p.10-15, 1987.

BALBINOT, F. E. **Estudo de alterações no metabolismo de carboidratos do bioindicador *Danio rerio* (zebrafish) em águas contendo íons Xantato**. Canoas, 62 P., 2015. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) - Centro universitário La Salle.

BARABARAN, S.C., TAYLOR, M.R., CASTRO, P.A., BAIER, H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity e c-fos expression. **Neuroscience**. Vol 131 (2005),p. 759-768.

BARBAZUK, K.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, A.; MCOHERSON, J. D.; JOHSON, S. L. The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. **GenomeRes**. 10: 1351-1358, 2000.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor one some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environmental Research**, v. 80, p.80-83, 1999.

BENLI, A.Ç.K; SARYKAIA, R; SEPICI-DINCEL, A; SELVI, M; SAHIN, D; ERKOÇ, F. Investigation of acutetoxicity of (2,4-dichlorophenoxy) aceticacid (2,4-D) herbicide oncrayfish (*Astacusteptodactylus* Esch. 1823). **PesticBiochemPhysiol**. V. 88, p. 296- 299, 2007.



BIDINOTTO, P.M; MORAES, G; SOUZA, R.H.S. Hepaticglycogenand glucose in eight tropical fresh water teleost fish: A procedure for Field determination of micro samples. **Boletim técnico CEPTA**, Pirassunga, V.10, p. 53-60, 1997.

BUTTNER, B.; BEYERSMANN, D. Modification of the erythrocyteanioncarrier by chromate. **Xenobiotica**, Londres, v.15, n.8-9, p.735-741, 1985.

CARVALHO, C.E.V.; SALOMÃO, M.S.M.B.; MOLISANI, M.M.; REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. Contribution of a medium-size tropical river to the particulate heavy-metal load for the South Atlantic Ocean. **Science Total Environment**, Reino Unido, v.284, p.85-93, 2002.

CHEIS, D. **Os danos que o cromo hexavalente pode causar à saúde**. Disponível em <<http://www.revistatae.com.br/noticiaInt.asp?id=6928>> Acesso em: 21 abr. 2016.

CONCEIÇÃO, D.P. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29**. Porto Alegre, 105p., 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

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

DANIO RERIO. Disponível em: <<http://www.arkive.org/zebra-danio/danio-rerio/image-G113073.html>>Acesso em 21 abr. 2016.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Tradução da 6ªed. Americana. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2007. 1186 p.

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

FRANZ, B. **Comportamento dos metais Cd, Zn, Pb no material particulado em suspensão na zona de mistura do Canal de São Francisco (Baía de Sepetiba, RJ)**. Rio de Janeiro, 124 p., 2004 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos, **Companhiade Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)**: São Paulo, 1990.

GOMES, M.R.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **BrasMed Esporte**, São Paulo, v.11, n.5, p.262-266, 2005.

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

MANZOORI, J.L; SOROURADDIN, M.H; SHEMIRAN, F. Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Chromium (VI) and Total Chromium in Drinking WaterbytheSorptionofChromiumDiphenylcarbazonewithSurfactantCoated Alumina. **Analytical Letters**, Irã, v.29, p. 2007-2014, 2006.



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

MERCK, **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ De acordo com a NBR 14725-4:2014.** Disponível em <http://www.merck-performance-materials.com/merck-ppf/detailRequest?unit=CHEM&owner=MDA&productNo=104862&docType=MSD&source=GDS&language=Z9&country=BR&docId=/mda/chemicals/msds/z9-BR/104862_SDS_BR_Z9.PDF> Acesso em 03/05/2016.

MONBET, P. Dissolved and particulate fluxes of copper through the Morlaix river estuary (Brittany, France): mass balance in a small estuary with strong agricultural catchments. **Marine Pollution Bulletin**, França, v.48, p.78-86, 2004.

NAKAGOME, F.; NOLDIN, J.; RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.17, p.117-122, jan./dez. 2007.

NORMA BRASILEIRA NBR: 15088:2011. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes - **Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)**, 2011.

NORMA BRASILEIRA NBR: 14725-2:2009. Produtos químicos – Informações sobre saúde, segurança e meio ambiente – Parte 2: Sistema de classificação de perigo- **Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)**, 2009.

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

PEREIRA, R. S. **Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Revista Eletrônica de Recursos Hídricos.** IPH – UFRGS. v. 1, n. 1. p. 20 – 36. 2004. Disponível em: <<http://www.vetorial.net/~regissp/pol.pdf>>. Acesso em 02 mai. 2016.

PIRES, K.A., **Efeitos de diferentes fontes e concentrações de cromo sobre aspectos metabólicos e desempenho em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus).** Belo Horizonte, 54p., 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

QUIEVRYN, G; PETERSON, E.; MESSER, J; ZHITKOVICH, A. Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI) ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. **Biochemistry**, Atlanta, v.42, n. 4, p.1062-1070, 2003.

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

RESOLUÇÃO 128 do CONSEMA (Conselho Estadual do Meio Ambiente), **Secretaria do Meio Ambiente**, Estado do Rio Grande do Sul, 9p., 07dez. 2006.

RESOLUÇÃO 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), **Sistema Nacional do Meio Ambiente**, 27p., 17 mar. 2005.



RESOLUÇÃO 410 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), **Sistema Nacional do Meio Ambiente**, 1p., 4mai. 2009.

RESOLUÇÃO 430 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), **Sistema Nacional do Meio Ambiente**, 9p., 13mai. 2011.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**: Ottawa, 2004, cap. 1.

SILVA, C.S. da; PEDROZO M. de F.M. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.5, 100 p, 2001.

STEARNS, D.M.; KENNEDY, L.J.; COURTNEY, K.D.; GIAGRANDE, P.H.; PHIEFFER, L.S.; WETTERHAHN, K.E. Reduction of chromium (VI) by ascorbate leads to chromium –DNA binding and DNA strand breaks in vitro. **Biochemistry**, Atlanta, v.34, n. 9, p.910-919, 1995.

SUAREZ, R. K.; MOMMENSEN, T. P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Journal of Zoology**. v.65, p.1869–1882, 1987.

VINCENT, J.B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. **Journal of the American College of Nutrition**, Florida, v.18, p.6-12, 1999.

WOLF, T.; KASEMANN, R.; OTTENWÄLDER, H. Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. **Carcinogenesis**, Oxford, v.10, n.4, p. 655-659, 1989.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva: Environmental Health Criteria, 1988.

XING L. & BEAUCHEMIN D. Chromium speciation at trace level in potable water using hyphenated ion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry with collision/reaction interface. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, Reino Unido, V.25, p.1046-1055, 2010.

YANG, J.L.; HSIEH, Y.C.; WU, C.W.; LEE, T.C. Mutation al specificity of chromium (VI) compounds in the hprt locus of Chinese hamster ovary-K1 cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v.13, n.11, p.2053-2057, 1992.

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