UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIA E EDUCAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

SAMIRA LEILA BALDIN

PERFIL DE TOXICIDADE AGUDA DE DIFERENTES PONTOS DO RIO LINHA TORRENS UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

CRICIÚMA

2017

SAMIRA LEILA BALDIN

PERFIL DE TOXICIDADE AGUDA DE DIFERENTES PONTOS DO RIO LINHA TORRENS UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

Trabalho de Conclusão do Curso, aprovado pela Banca Examinadora, para obtenção do Grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Toxicidade ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico

CRICIÚMA
2017

PERFIL DE TOXICIDADE AGUDA DE DIFERENTES PONTOS DO RIO LINHA TORRENS UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

Trabalho de Conclusão do Curso, aprovado pela Banca Examinadora, para obtenção do Grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Toxicidade ambiental.

Criciúma, 23 de novembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico - Universidade do Extremo Sul Catarinense - Orientador

Prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade - Universidade do Extremo Sul Catarinense

MSc. Gustavo Colombo Dal Pont- Universidade do Extremo Sul Catarinense

A aqueles que sempre me apoiaram e possuem

a minha eterna gratidão e respeito: meus pais, Sandra e Sergio

AGRADECIMENTOS

Àquele que me amou primeiro, Deus, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Agradeço imensamente, de coração, aos meus pais e meus irmãos por todo o apoio, paciência e compreensão, por não me deixar desistir e me ajudarem em tudo que era possível.

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Pacheco Rico por ter me dado a oportunidade de crescer em conhecimento e me mostrando que eu poderia fazer sempre mais, e me instigando a pesquisar mais e mais. Obrigado por toda dedicação, paciência, amizade e confiança. Sou extremamente grata.

À minha equipe do laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia (LASINEP), com o modelo animal zebrafish, pois acredito que não conseguiria sozinha por toda a ajuda na limpeza dos aquários, colocação e retirada de sítio, todo o cuidado e dedicação com os embriões.

A Maria Cecília, Cissa por me ajudar nas referências e me ouvir e me ajudar a relaxar quando eu estava enlouquecendo.

Às minhas amigas, que conheci e me acompanharam na graduação e sempre me ajudaram, Natalia e Mikaela e aos meus amigos Lucas, Fernanda, Elaine e Maria Eduarda.

A minha amiga Karolina que mesmo em São Paulo me apoia com suas palavras reconfortantes e carinhosas, muito obrigada amiga.

Aos colegas do laboratório NEUROTOX pela amizade e conversas durante a tarde, e toda a troca de conhecimento.

À professora Miriam da Conceição Martins por ter me ajudado a conhecer a pesquisa que é minha paixão, obrigada por tudo.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense, bem como, todos os professores do curso de Ciências Biológicas bacharelado pelo conhecimento adquirido ao longo da graduação.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas disponibilizadas para a realização dessa pesquisa.

A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.

Albert Einstein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Mapa de Localização do Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, Santa Catarina. 20

Figura 2: Mapa dos pontos amostrados no Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, Santa Catarina. 21

Figura 3: Coagulação de um embrião. 23

Figura 4: Embrião sem alteração com 24hpf 24

Figura 5: Taxa de sobrevivência da exposição dos diferentes pontos do Rio Linha Torrens em embriões de peixe-zebra 26

Figura 6: Proporção de sobrevivência de diferentes pontos do Rio Linha Torrens em embriões de peixe-zebra 27

Figura 7: Formação de somito em embriões de peixe-zebra nos diferentes pontos do Rio Linha Torrens. 27

Figura 8: Eclosão prévia e coagulação observada em embriões de peixe-zebra expostos em diferentes pontos do Rio Linha Torrens. 28

Figura 9: Efeito da toxicidade aguda de diferentes pontos do Rio Linha Torrens sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em embriões de peixe-zebra 29

Tabela 1: Protocolo de avaliação rápida dos pontos amostrados no Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, SC 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina (do inglês, *acetylcholine*)

AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)

ANOVA – Análise de variância

APA – Área de Proteção Ambiental

CESTESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ChAT – colina acetiltransferase (do inglês, *choline acetyltransferase*)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral

FET – Teste de toxicidade embrionária (do inglês *Fish Embryo toxicity*)

HPF – horas pós fertilização

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

PAR – Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats

SNC – Sistema nervoso central

RESUMO

O Rio Linha Torrens, localizado no município de Morro da Fumaça, vem sofrendo diversos impactos ambientais ocorrendo ao longo dos anos devido ao seu decorrente uso inadequado, através da extração de areia, mineração de carvão e fluorita, e a liberação de efluentes industriais e domésticos no rio. Um dos principais impactos é o processo de extração mineral e liberação de efluentes domésticos e industrias, gerando diversos contaminantes tóxicos. O peixe-zebra pode ser utilizado para diversos estudos sobre o monitoramento ecológico e avaliação de poluentes, como metais pesados e poluentes químicos. O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de toxicidade aguda de seis diferentes localidades ao longo do leito do rio utilizando embriões e larvas de peixe-zebra. Foi realizada a coleta de água superficial de cada um dos seis pontos, em diferentes áreas consideradas rurais e urbanas, desde a sua nascente a foz. Para isto, foram utilizados animais adultos como matrizes para a reprodução e seus ovos foram coletados (n=20). Em seguida, foi realizado o teste de toxicidade embrionária (FET-*Fish Embryo Toxicity*). Esse teste FET analisa alterações morfológicas e parâmetros de sobrevivência que são observados a cada 24 horas pós fertilização (hpf) até 96 hpf. Os resultados mostraram uma maior taxa de mortalidade nos embriões nos pontos 6 (95%), 1, 3 e 4 (55%)e nos pontos 2 e 5 (30%), sobre a formação de somito foi observada nos embriões a partir de 48hpf sendo que os pontos 1, 2 e 4 apresentaram (15%), o ponto 5 (35%) e o ponto 3 (70%), sobre a coagulação dos embriões foi observado nos pontos 1 e 2 (25%), o ponto 3 (5%), ponto 4 (15%). Com relação ao parâmetro bioquímico, foi avaliado a atividade da acetilcolinesterase (AChE), observando que neste estudo houve uma diferença significativa dos pontos 1 e 2, em relação ao controle. Podemos então concluir que a toxicidade embrionária foi maior nos pontos 6, 4 e 3 mostrando que as regiões mais urbanizadas podem apresentar diversas toxinas ambientais e que através dos agrotóxicos que podem estar presentes nos pontos 1 e 2, os mesmos mostraram a alteração da atividade da AChE, podendo ser um indicador da qualidade ambiental, através dos embriões de peixe- zebra.

Palavras-chave: Toxicologia ambiental. AChE. Morro da Fumaça. FET. Zebrafish.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 OBJETIVOS 10
1.1.1 Objetivo geral 10
1.1.2 Objetivos específicos 10
2 REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1 RIO LINHA TORRENS 12
2.2 MINERAÇÃO DE AREIA, FLUORITA E CARVÃO MINERAL 12
2.3 ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS 15
2.4 O PEIXE-ZEBRA 16
2.5 SISTEMA COLINÉRGICO: ATIVIDADE DA AChE 17
3 MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS TESTES 19
3.2 ÁREA DE ESTUDO 19
3.3 ANIMAIS 22
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 23
3.4.1 Aspectos Éticos 23
3.4.2 Coleta das Amostras de Água 23
3.4.3 Parâmetros morfológicos 24
3.4.4 Parâmetro bioquímico 25
3.4.5 Parâmetro ambiental 26
3.5 ÁNALISE ESTATÍSTICA 26
4 RESULTADOS 27
5 DISCUSSÃO 31
6 CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS 36
ANEXOS 44
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL 45
ANEXO II – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL 46
ANEXO III – QUADRO 1 DO PAR 47
ANEXO IV – QUADRO 2 DO PAR 48

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a conservação sustentável dos mananciais hídricos, da biodiversidade e dos recursos naturais vêm ganhando destaque no Brasil hodierno. Neste contexto, torna-se relevante compreender a toxicidade de uma bacia hidrográfica.

A bacia do Rio Linha Torrens que drena parte do município de Morro da Fumaça, localizado no extremo sul catarinense, faz parte da Bacia do Rio Urussanga, sendo um afluente da margem direita. Atualmente negligenciado pela população local devido ao decorrente uso inadequado dos recursos hídricos, tendo ao longo dos anos sua margem ocupada por instalações habitacionais, industriais e desenvolvendo atividades no seu entorno, como a agropecuária e extração mineral, gerando vários problemas ambientais.

Embriões de *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), mais conhecidos como peixe-zebra, são usados em diferentes tipos de estudo como uma forma de verificar o impacto ambiental, mais precisamente em estudos de toxicidade aguda. A realidade do impacto ambiental causado ao longo dos anos pelo uso inadequado do Rio Linha Torrens, pode ter provocado uma mudança na biota aquática e na composição físico-química da água. Diante desse pressuposto, o presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de toxicidade aguda a partir de amostras obtidas em diferentes localidades, utilizando embriões de peixe-zebra como meio para ensaio toxicológico.

Nesse sentido, o estudo revela uma importância para a comunidade sobre a verificação da possível toxicidade provocada pelo consumo da água proveniente do Rio Linha Torrens e a qualidade do ecossistema aquático, visto que não existem estudos sobre tal tema na região.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade aguda em diferentes localizações do Rio Linha Torrens usando embriões/ larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) como bioindicador da biota aquática.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade dos embriões de peixe-zebra por meio da proporção de sobrevivência.
- Analisar a toxicidade aguda dos diferentes pontos do Rio Linha Torrens sobre os embriões de peixe-zebra através de alterações morfológicas.

- Avaliar a toxicidade aguda dos diferentes pontos do Rio Linha Torrens por meio da avaliação de parâmetro bioquímico pela atividade da acetilcolinesterase
- Investigar a potencial influência da água dos diferentes pontos Rio Linha Torrens sobre o a eclosão das larvas de peixe-zebra.
- Considerar através do Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats a situação atual dos pontos avaliados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RIO LINHA TORRENS

A bacia do Rio Urussanga se localiza no Extremo Sul Catarinense, dentro da bacia do Rio Araranguá, abrange os municípios de Urussanga, Cocal do Sul, Pedras Grandes, Treze de Maio, Sangão, Morro da Fumaça, Criciúma, Içara Balneário Rincão e Jaguaruna, com uma população próxima de 118 mil habitantes distribuídos pela bacia em uma área total 679,16 km², encontrando-se assim a bacia do Rio Linha Torrens. (SIRHERSC, 2017).

O Rio Linha Torrens é um dos afluentes da margem direita da bacia hidrográfica do Rio Urussanga e seus estuários estão inseridos em uma das mais importantes unidades de conservação da região, sendo a Área de Proteção Ambiental (APA) da Baleia Franca (BRASIL, 2000; GEREMIAS, 2008). Possui atualmente a importância negligenciada pela população local devido ao decorrente uso inadequado dos recursos hídricos. Ao longo dos anos a população vem ocupando as margens do rio, desenvolvendo atividades no entorno tais como a agropecuária, indústrias, urbanização e extração mineral, gerando vários problemas ambientais sobre essa bacia (SILVEIRA, 2011). A área da bacia do Rio Linha Torrens apresenta uma área de 25,87 km², com uma população residente próxima de 9.100 habitantes representando aproximadamente 56% da população total do município de Morro da Fumaça (BRASIL, 2010).

O município de Morro da Fumaça está localizado na parte leste da região Carbonífera, onde a bacia do Rio Linha Torrens está inserida, a área do rio drena muitos bairros e localidades no município de Morro da Fumaça, tais como as localidades de Linha Barracão, Linha Frasson, Mina Visconde, Linha Pagnan, Santa Cruz, Linha Torrens, além dos bairros Maccari, Centro, Bortolatto, Jussara, Capelinha, Esperança, Monte Verde, Palladini, Naspolini, de Costa e Ibirapuera (SILVEIRA, 2011).

2.2 MINERAÇÃO DE AREIA, FLUORITA E CARVÃO MINERAL

A mineração é uma das atividades humanas que mais gera alterações na superfície terrestre, afetando a área lavrada e o entorno, causando impactos negativos sobre a água, o solo, o ar, o subsolo, o lençol freático, a fauna e a flora além da paisagem como um todo (NOGUEIRA, 2016). A mineração também gera uma grande quantidade de rejeitos, os quais não são aproveitados economicamente, sendo estes ricos em minerais sulfetados que podem

se transfigurar fontes produtoras de drenagem ácida (BROFFT et al., 2002; CAMPOS et al., 2010).

Segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 010/1990 dispõe que toda atividade mineradora causa modificações no ambiente denominado impacto ambiental e considera que qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante da atividade humana, que direta ou indiretamente afeta a saúde, a segurança e o bem-estar da população, as atividades sociais e econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos naturais. Foi criada em 1978 a Lei Federal n°6567, que dispõe sobre o regime especial de exploração e o aproveitamento de substâncias minerais através do licenciamento ambiental e com validade apenas após o seu registro no Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) (BRASIL, 1978).

A extração de areia em cursos d'água ou entorno é uma importante atividade mineradora, sendo a areia considerada um produto necessário na construção civil (LELLES, 2004). Embora a mineração de areia seja necessária, ela altera a paisagem do lugar minerado e degrada o meio ambiente (VIEIRA; REZENDE, 2015). A mineração de areia ocorre em locais onde houve a deposição de material sedimentar ao longo das eras geológicas, sendo normalmente encontrado em locais próximos a fundo de vales e aos rios (ANNIBELLI, 2006). Segundo o Sumário Mineral/2001, demostrou que a mineração de areia em leitos de rios é responsável por 90% da produção nacional do material sedimentar. Os dados do Anuário Mineral/2010, determinou que havia sido minerado 747.554t de areia industrial apenas no estado de Santa Catarina.

A fluorita é usada como matéria-prima para obtenção de diversos produtos, principalmente, na área química, metalurgia e cerâmica, sendo também a maior fonte comercial de flúor usada como catalisador na produção de aquilato destinado a produção de gasolina (DNPM, 2014; SAMPAIO; ANDRADE; BALTAR, 2005). A produção interna do país do minério bruto em 2013 foi de 68.472,17t (DNPM, 2014). Conforme o Sumário Mineral Brasileiro 58% das reservas brasileiras de fluorita localizam-se no estado de Santa Catarina, seguido do Paraná com 29% e o Rio de Janeiro com 13% (DNPM, 2014). O processo de lavra das minas de fluorita é subterrâneo, com exceção da mina de Cerro Azul, que se encontra no estado do Paraná, cujo método de lavra utilizado é em bancadas (DNPM, 2009). A maior jazida de fluorita no estado de Santa Catarina foi descoberta em 1961 na localidade de Segunda Linha Torrens, no município de Morro da Fumaça, onde 50% da

produção nacional provinham do estado de Santa Catarina, atualmente a usina de Morro da Fumaça está desativada (CRUZ, 2015).

O carvão mineral não é um minério propriamente dito, pois não apresenta uma composição química definida, mas trata-se de um recurso energético, que compete com o petróleo e o gás natural. Historicamente o carvão foi a principal fonte energética até o começo do século passado. Com o passar dos anos o petróleo ganhou a importância e começou a substituir o carvão (CHAVES, 2008). O carvão brasileiro utilizado na indústria siderúrgica é produzido apenas pelos estados da região Sul do país, sendo o único que pode adaptar-se como fonte de energética em termoelétricas (BRASIL, 2010; MARTINS, 2005).

Entre os contaminantes provenientes da mineração encontram-se as drenagens ácidas de mina que apresentam baixos valores de pH e elevada concentração de metais como alumínio, ferro e manganês (DIAS, 1998; GEREMIAS et al., 2003). Outros metais como o alumínio e manganês, quando presentes em minerais associados ao carvão, podem ser lixiviados nas drenagens em virtude dos baixos valores de pH do meio, com consequente elevação da concentração destes elementos nas mesmas (SASOWSKY; FOOS; MILLER, 2000). Esses metais pesados tem uma importância ecotoxicológica devido a sua persistência e toxicidade (WEBER et al., 2013). A disposição inadequada das águas efluentes e de rejeitos sólidos da mineração de carvão na bacia hidrográfica do sul de Santa Catarina acarretou severa degradação ambiental, tendo sido, em 1980, considerada área crítica nacional no que se refere ao controle da poluição e qualidade ambiental (CARVALHO, 2008).

O rejeito de mineração é um dos principais contaminantes, oriundo da atividade mineradora de carvão, trazendo sérios problemas ambientais como a supressão de áreas de vegetação, reconfiguração de superfícies topográficas, impacto visual, aceleração de processos erosivos, inviabilidade de uso alternativo do solo, emissão de gases e partículas no ar, contaminação de recursos hídricos, destruição da flora e fauna local e comprometimento da vida da população (GEREMIAS et al., 2008; BITAR, 1997). Além dos rejeitos, a mineração de carvão pode gerar impactos ambientais resultantes da atividade de preenchimento mineral em subsolo relacionada a processos de oxidação da pirita e posterior geração de drenagem ácida de mina (DAM) no subsolo (HEEMANN; COSTA, 2008). As drenagens ácidas são capazes de atingir os recursos hídricos e, uma vez no ambiente aquático, seus metais podem permanecer em solução na forma de complexos ou íons livres, podendo então ser absorvido pelos organismos vivos. Têm-se sugerido que em ambientes aquáticos de elevada acidez e concentração de metais em níveis intoleráveis pode haver dano à biota, como

processos carcinogênicos, mutagênicos, distúrbios respiratórios e até osmorregulatórios o que podem levar a morte (GEREMIAS et al., 2008).

2.3 ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS

Os ecossistemas aquáticos executam inúmeras funções ambientais valiosas, eles reciclam nutrientes, purificam a água, atenuam as enchentes, recarregam as águas subterrâneas e fornecem habitat para a vida selvagem (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992). Esses ecossistemas são considerados os receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando suscetíveis à ação de contaminantes terrestres, que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento pluvial e também de efluentes domésticos e industriais, que são lançados sem tratamento diretamente nestes locais (DOMINGOS, 2006). Esses impactos são agravados em corpos de água que recebem fluxos de metais, sendo fixo ou intermitente que pode resultar em graves efeitos sobre a biota bentônica (DOIG; LÍBER, 2006). Os ecossistemas aquáticos são expostos normalmente a uma mistura de substâncias, sendo aparente nas águas de superfícies onde existe uma diversidade de substâncias tóxicas, como resultado da atividade humana realizada em toda a bacia hidrográfica (SILVA; CEREJEIRA, 2012).

A qualidade do ambiente pode ser definida pela presença de substâncias inorgânicas ou orgânicas, e sua composição e estrutura da biota presente no corpo de água. As características da água dos rios dependem do histórico geológico da região, do tipo de solo que ocorre às bacias de drenagem, do clima, das condições geoquímicas, da cobertura vegetal, da geomorfologia e principalmente a ação antrópica (STROHSCHOEN, 2009).

A resolução do CONAMA n° 357 de 2005 dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais quanto ao enquadramento dos corpos d’água superficiais, estabelecendo limites individuais a cada substância a ser analisada. Essa resolução foi completada e alterada pela resolução n° 430/2011 do CONAMA que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Segundo relatórios de qualidades de águas superficiais da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, em 2012, as concentrações detectadas em ambientes naturais no Brasil mostraram que 50% dos corpos d’água avaliados estavam em desacordo com os padrões estabelecidos.

2.4 O PEIXE-ZEBRA

Em sua maioria, os organismos bioindicadores são utilizados em metodologias cujo o objetivo consiste em testar a sua sobrevivência e, para este propósito, tem-se aplicado teste de toxicidade aguda em microcrustáceos como *Daphnia magna*, e subaguda em plantas como *Allium cepa*, além de outros organismos como bactérias, fungos e animais (SVENSSON et al., 2005; SAURABH et al., 2005; GEREMIAS, 2008). Os peixes podem ser usados como bioindicadores em vários ecossistemas aquáticos, devido a sensibilidade desses organismos as mudanças ambientas como a presença de químicos na água, o *Danio rerio*, mais conhecido peixe-zebra, está no topo da cadeia trófica aquática em comparação com outros bioindicadores, devido a sua sensibilidade proporcionando uma visão integrada de todo o meio aquático (SOARES et al., 2015).

O peixe-zebra é um pequeno teleósteo de água doce com três a quatro cm de comprimento, da família Cyprinidae, nativo do sul da Ásia que pode ser facilmente mantidos e criados em laboratório (DAMMSKI et al., 2011). Além disso, o peixe-zebra é econômico, apresentando diversas facilidades como a simples criação, a fácil estocagem de um número elevado de animais um espaço relativamente pequeno (LAGGNER, et al., 2012). As fêmeas atingem a maturidade sexual entre 3-4 meses podendo gerar a cada 2-3 dias e em uma única oviposição várias centenas de ovos (KIMMEL et al., 1995).

Este organismo tem ganhado espaço nas últimas décadas na pesquisa experimental (GERLAI; LEE; BLASER, 2006; EGAN et al., 2009). A utilidade do peixe-zebra tanto em estágio larval quanto adulto na neurociência cresceu acentuadamente, sendo considerada uma espécie de vertebrado com altas propriedades fisiológicas e alta homologia genética com os seres humanos, além da facilidade de manipulação genética sua similaridade morfológica e fisiológica como o Sistema Nervoso Central (SNC) (GERLAI, 2010, GERLAI, 2011; SUEN et al., 2013). Além disso, o peixe-zebra oferece diversas facilidades para testes de toxicidade aguda, com objetivo de identificar níveis toxicológicos para identificação de danos ambientais, envolvendo riscos na avaliação de produtos químicos, biocidas, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e efluentes (SCHOLZ et al. 2013). Segundo Qian e colaboradores (2015), as interações entre os sedimentos, poluentes, e organismos são altamente complexas.

Estudos mostram que o teste utilizando embriões de peixe-zebra ganhou interesse como um substituto de outras espécies de peixes como *Cyprinus carpio* (L., 1758), *Oreochromis niloticus* (L., 1758) e outros modelos adotados. (NAGEL 2002; BRAUNBECK

et al., 2005). Atualmente, também tem sido amplamente utilizado em diferentes tipos de estudo como distúrbios cardíacos e vasculares (ASANI; PETERSON, 2014; WILKINSON; JOPLING; VAN EEDEN, 2014), neurotoxicidade, (ESCH et al., 2012; SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011) e genotoxicidade (SCHOLZ e MAYER, 2008; BOURRACHOT et al., 2014).

Para tal, a utilização do teste de toxicidade aplicado em embriões de peixe-zebra se baseia no teste de Toxicidade embrionária - *Fish Embryo Toxicity* (FET) observando quatro tipos de alterações morfológicas segundo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD, 2013): a coagulação, anormalidades na formação de somitos, o descolamento de cauda, e frequência cardíaca. Além disso, parâmetros bioquímicos permitindo verificar, por exemplo, o uso da atividade da AChE.

2.5 SISTEMA COLINÉRGICO: ATIVIDADE DA AChE

O sistema colinérgico atua em diversas funções no SNC tais como o processamento de memória e aprendizagem, nas funções sensoriais e no desenvolvimento de estruturas cerebrais (ZIRGER et al., 2003; BARKER; WARBURTON, 2009; ANGLADE; LARABI-GODINOT, 2010; GIOVANNINI; LANA; PEPEU, 2015). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema colinérgico, sintetizada pela enzima colina acetil-transferase (ChAT), produzida a partir de acetil-coenzima A (Acetil-CoA) e colina e armazenada em vesícula. A ACh funciona no SNC como um mediador químico de sinapses, e também atua no sistema nervoso periférico e na junção neuromuscular. Depois da exocitose vesicular, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica e rapidamente degradada pela enzima AChE em acetato e colina, e grande parte da colina resultante é captada e reutilizado na síntese de nova ACh (ZIRGER et al. 2003; VENTURA et al., 2010). A AChE é expressada em vários tecidos, como o SNC e os músculos (BEHRA et al., 2002).

Compreende-se que a atividade da AChE é considerada extremamente especifica para pesticidas organofosforados e carbamatos (KAIS et al., 2015). E alguns inseticidas como os clorpirifos e organofosforados são amplamente utilizados em todo mundo, os quais provocam sérios problemas ambientais (FU et al., 2013). Segundo Azevedo e Chasin, (2003), inseticidas fosforados, inibem a atividade da AChE. Diversos estudos descrevem que clorpirifos tem uma variedade de efeitos, bioquímicos e alterações histopatológicas (XING et al., 2012), estresse oxidativo (KAVITHA; RAO, 2008), genotoxicidade (ALI et al., 2009), toxicidade

reprodutiva (FARAG et al., 2010; NISHI; HUNDAL, 2013) e alterações endócrinas (VISWANATH et al., 2010).

A inibição da AChE tem sido amplamente utilizada como biomarcador de neurotoxicidade por substâncias puras ou amostras ambientais em diferentes tecidos e modelos animais sensíveis a determinados níveis de contaminação aquática (PERKINS; EVERETT; SCHLENK, 2000; ARUFE et al., 2007; DE DOMENICO et al., 2013; FAN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). A ligação competitiva dos agonistas para o centro de ação da AChE leva à acumulação de acetilcolina dentro das fendas sinápticas, deste modo uma inativação da tradução de sinais através das sinapses colinérgicas (KAIS et al., 2015; FULTON; KEY, 2001).

Conforme Kais et al. (2015), estudos documentados em geral empregando os embriões de peixe-zebra representam um modelo de adequação, não só capaz de revelar a inibição da AChE, mas também para investigar vários modos de ação neurotóxica. Estudos realizados com Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mostraram que o efluente de carvão gerou dano oxidativo em lipídeos e ao DNA, bem como o comprometimento das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutationa transferase e glutationa reduzida (BENASSI et al., 2006). O neurotransmissor ACh desempenha um papel crucial nas sinapses centrais e neuromusculares do sistema colinérgico. Metais presentes no meio ambiente mesmo que em baixas quantidades podem alterar os neuromastos, alterando assim a locomoção dos embriões (SONNACK et al., 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

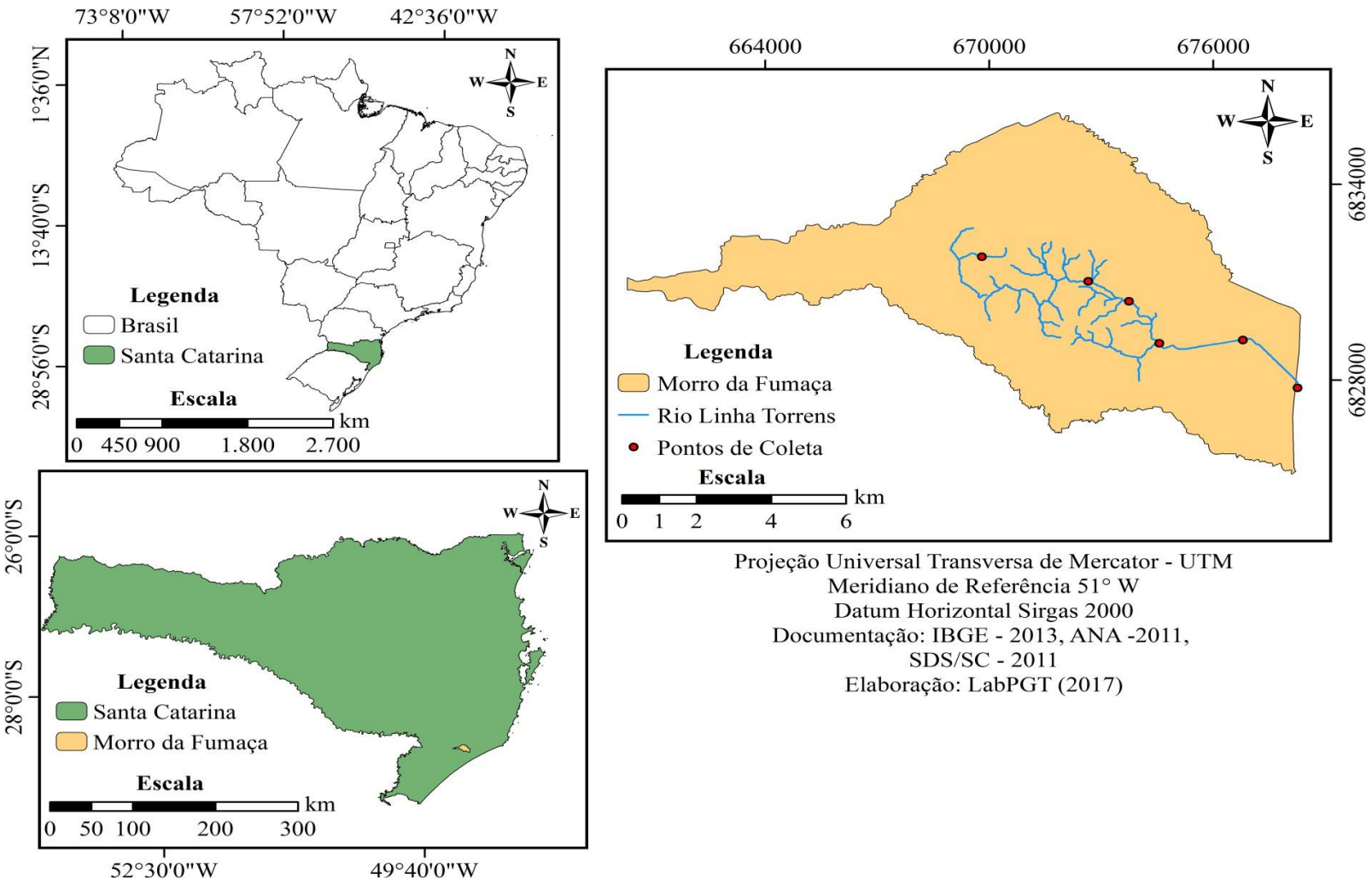
Os testes para a avaliação da toxicidade aguda e todas as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção, unidade de Sinalização Neural e Psicofarmacologia e no Laboratório Multiusuários do Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde (MULTILAB) para realização das fotografias de alterações morfológicas.

3.2 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado na bacia hidrográfica do Rio Linha Torrens localizado no município de Morro da Fumaça entre as coordenadas UTM 674894.76649x 6829332.69775y no estado de Santa Catarina, conforme a Figura 1. Essa bacia corresponde aproximadamente 25,87 km² em relação ao tamanho do município (IBGE, 2010). O clima da bacia segundo a classificação de Köppen é subtropical mesodérmico úmido com verão quente (Cfa).(ALVARES et al., 2013). As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, com volume anual variando entre 1.300 e 1.500 mm.

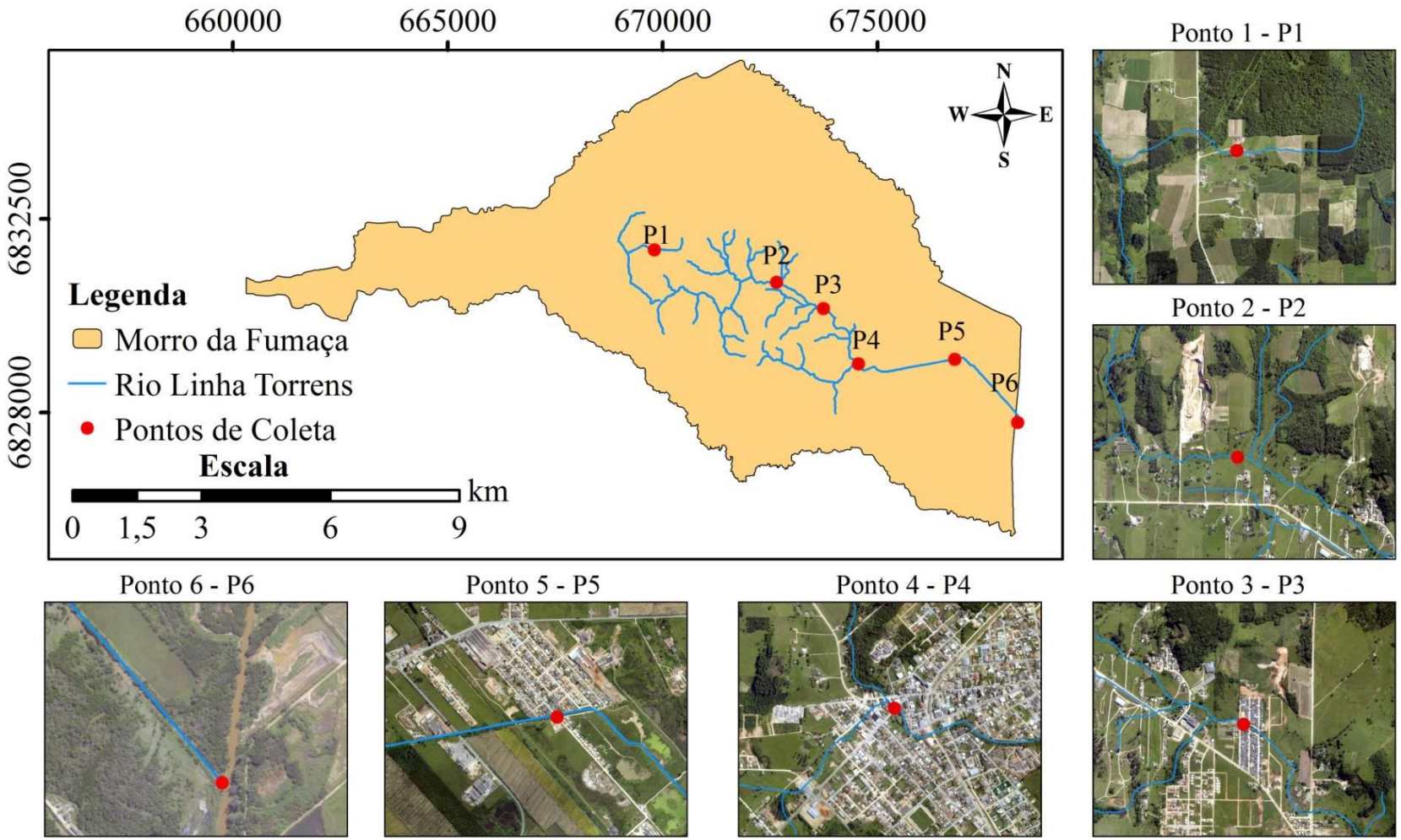
Os pontos de amostragem foram definidos ao longo do eixo principal do rio, e as coordenadas em UTM de cada um dos pontos amostrados neste estudo são: P1- 0669804x 6831779y; P2- 0672654x 6831028y; P3- 0673745x 6830414y; P4- 0674560x 6829128y; P5- 0676797x 6829231y; P6- 0678261x 6827761y. O ponto 1 é a nascente do rio, o ponto 2 esta localizado em uma área rural, o ponto 3 é próximo de uma comunidade, o ponto 4 esta localizado no centro da cidade e o ponto 5 em um bairro mais afastado do centro e o ponto 6 é a foz do Rio Linha Torrens, como pode ser observado no Mapa dos Pontos amostrados no rio Linha Torrens, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 1: Mapa de Localização do Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, Santa Catarina.



Fonte: Laboratório de Planejamento e Gestão Territorial, 2017.

Figura 2: Mapa dos pontos amostrados no Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, Santa Catarina.



Fonte: Laboratório de Planejamento e Gestão Territorial, 2017.

3.3 ANIMAIS

Para obtenção dos embriões de *Danio rerio* (tipo *short-fin*), foram escolhidos os animais matrizes mais viáveis para reprodução, trazidos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo posteriormente mantidos no Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com um ciclo claro/escuro de 14/10h controlado por fotoperíodo (luzes acendem às 7h; luzes apagadas às 21h), com condições de salinidade, níveis de amônia e de condutividade adequados na água, alimentados quatro vezes ao dia com ração flocada e artêmia e a temperatura da água regulada em 26°C - 28°C. Os animais foram mantidos em aquários de vidro menores (6L) com uma densidade de quatro machos e cinco fêmeas com filtração mecânica auto-limpante e limpeza de resíduos sólidos, numa densidade de dois animais por litro de água.

No processo de coleta de ovos, foi adicionado no aquário matriz um aquário pequeno com o fundo vazado, denominado sitio de reprodução, permitindo a passagem dos ovos e sua queda ao fundo, impedindo que eles sejam ingeridos pelos peixes. Na manhã seguinte foi retirado o sitio de reprodução, e no momento em que as luzes se acendem acontece a postura dos ovos variando de uma a três horas após as luzes acesas.

Após a reprodução e retirada dos ovos fecundados foi realizada a limpeza dos ovos, foram selecionados através de uma lupa os ovos fertilizados que posteriormente foram dispostos em placas de poliestireno não estéril de 24 poços com um ml das soluções dos diferentes pontos do Rio Linha Torrens. Os embriões foram mantidos em uma câmara incubadora na temperatura de 28$\pm$ 1°C, período claro/escuro e umidade controlada. Os ovos e futuras larvas foram avaliados diariamente para as análises morfológicas de acordo com o teste FET e limpeza ou troca parcial da água quando necessário. O teste de toxicidade embrionária (FET) analisa quatro alterações morfológicas: coagulação (Figura 3), formação de somito, descolamento de cauda e batimento cardíacas sendo estas alterações visualizadas a cada 24hpf com o auxílio de um microscópio até o fim do teste em 96hpf, porém existem outros tipos de alterações que são observadas neste teste como a eclosão prévia das larvas que naturalmente ocorreria em 24hpf, mas quando existe alguma alteração no meio ocorre em 48hpf. Para os testes bioquímicos utilizaram-se os animais da análise morfológica. Após o término do teste FET foi realizado a quantificação da atividade enzimática da AChE.

Para a determinação dos protocolos de criação e manutenção dos animais foi utilizado o Manual de Criação do Zebrafish em Biotério (DAMMSKI et al., 2011).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram coletadas amostras superficiais de diferentes localidades do Rio Linha Torrens, em 25 de julho de 2016 com cerca de 1L para cada ponto e armazenadas em geladeira até o inicio da exposição. Em seguida, os embriões foram distribuídos individualmente em placas de poliestireno não estéril de 24 poços contendo um ml da água coletada dos pontos, e o perfil de toxicidade foi avaliado a cada 24 horas pós-fertilização (hpf), os embriões foram avaliados com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

O protocolo utilizado para este estudo foi o FET (*Fish Embryo Toxicity*) que recomenda que para a avaliação dos quatro parâmetros morfológicos, recomendando o uso de 20 embriões por grupo. Sendo assim, foram seis grupos consistindo nas seis localizações (120 embriões). Após o término do teste FET foi realizado a atividade da AChE e no momento da coleta das amostras de água foi realizado um Protocolo de Avaliação Rápida de Diversidades de Habitats.

3.4.1 Aspectos Éticos

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Ética Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob os números de protocolo n. 062/2016-1 e n. 035/2017-1 (Anexos I e II).

3.4.2 Coleta das Amostras de Água

A coleta das amostras superficiais foi realizada no dia 26 de julho de 2016 com o auxilio de um balde de 5L e uma corda. O balde foi limpo durante três vezes com a água do ponto antes de ser armazenada em uma garrafa plástica transparente e estéril, e após essa lavagem foi coletado 1L da água de cada ponto amostral realizando o mesmo processo de lavagem do balde de 5L. Após a coleta de todos os pontos as amostras formam levadas e armazenadas em geladeira até o momento do teste de toxicidade aguda nos embriões, e com relação aos dados de pluviosidade e temperatura nos dois dias anteriores a coleta não houve precipitação ocorrendo apenas no dia 27 de julho, após a coleta das amostras.

3.4.3 Parâmetros morfológicos

Baseando-se no protocolo do teste FET foram observados quatro tipos de alterações no desenvolvimento embrionário: a coagulação conforme a Figura 3 mostrando a letalidade dos embriões, ausência de formação de somitos, falta de separação entre a cauda e o saco vitelínico e alterações na frequência cardíaca no período de 24 a 96hpf. Um exemplo de embrião sem alteração esta presente na Figura 4. O teste analisa essas quatro letalidades, mas, existem efeitos secundários que podem ser analisados como a eclosão prévia dos embriões que naturalmente ocorreria em 72hpf, porém quando existe alguma substância que altera essa eclosão ocorre em 48hpf. Após o término do FET, foi realizada a quantificação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), após as 96hpf as larvas foram separadas e eutanasiadas para a realização da técnica.

Figura 3: Coagulação de um embrião em 24hpf.

Fonte: do autor, 2017.

Figura 4: Embrião sem alteração com 24 hpf.

Fonte: do autor, 2017.

3.4.4 Parâmetro bioquímico

Após as 96hpf de exposição às amostras de cada localidade referente ao rio, larvas de peixe-zebra em um "*pool*" de cinco animais foram homogeneizadas 400 µl de tampão fosfato a 0.1 molar (KAIS et al., 2015) e a atividade da enzima AChE será determinada pelo ensaio colorimétrico descrito por Ellman (1961). As células foram lavadas e ressuspendidas em solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4) e o extrato total de proteína foi incubado com tampão fosfato (pH 7,4) e 10 mM de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) durante cinco minutos. A essa preparação, 8 mM de acetiltiocolina foi adicionado e a absorbância lida em 412 nm por 10 minutos. Atividade foi medida pela reação de grupamentos tióis, liberados da degradação de acetiltiocolina, com DTNB. Resultados foram expressos como µmol/min/mg de proteína. Para a quantificação de proteínas foi realizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4.5 Parâmetro ambiental

Para a análise do parâmetro ambiental foi utilizado o Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats (PAR) em bacias hidrográficas que verifica o nível de preservação das condições ecológicas dos trechos escolhidos para este estudo. O protocolo é dividido em dois quadros avaliando 22 características conforme os Anexos III e IV. Sendo que o Quadro 1 (Anexo III) pretende avaliar as caraterísticas dos trechos que estão impactados decorrentes da atividade antrópica e o Quadro 2 (Anexo IV) que avalia as condições do habitat e o nível de conservação das condições naturais. O protocolo avalia um conjunto de parâmetros em categorias descritas e pontuadas com os valores de 0 a 4 no Quadro 1 e os valores de 0 a 5 no Quadro 2, sendo esta pontuação atribuída para cada parâmetro com base na observação das condições do trecho analisado. Através de um somatório de cada parâmetro analisado se obtêm o nível de preservação das condições ecológicas dos trechos estudados, sendo que o trecho onde de 0 a 40 representa trechos “impactados”, de 41 a 60 trechos “alterados” e acima de 61 trechos “naturais” (CALLISTO et al., 2002).

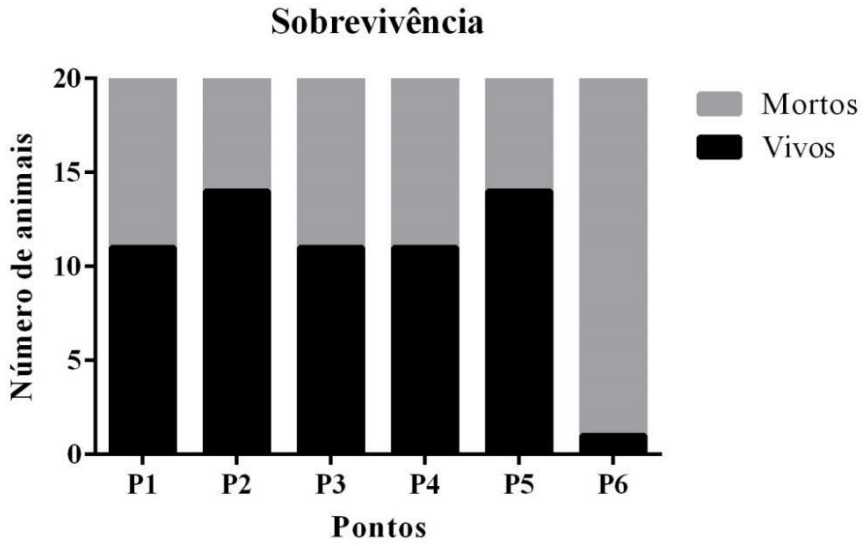
3.5 ÁNALISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA, sendo expressos como média ± desvio padrão seguido do teste post hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significante. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0

4 RESULTADOS

Inicialmente, foram avaliados os parâmetros morfológicos dos embriões e larvas de peixe-zebra expostos a água de diferentes pontos do Rio Linha Torrens, da água coletada em julho de 2016. Verificou-se que houve uma maior taxa de mortalidade nos embriões nos pontos 6 com 95%, nos pontos 1, 3 e 4 a taxa de mortalidade foi de 55% e nos pontos 2 e 5 foi 30% considerando que os pontos 1 e 2 são localizados em área rural e os pontos 3, 4 e 5 são área urbana e o ponto 5 a foz do rio. (Figura 5).

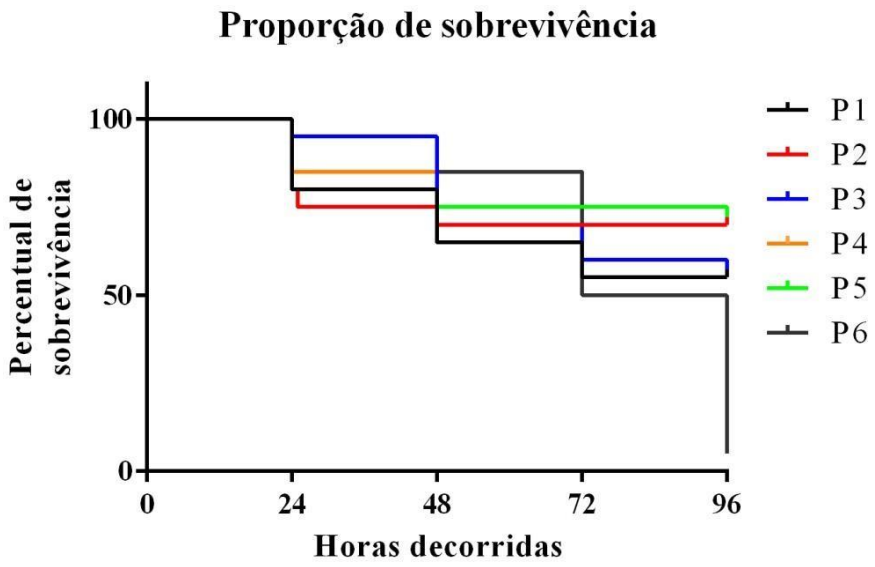
Figura 5: Taxa de sobrevivência da exposição dos diferentes pontos do Rio Linha Torrens em embriões de peixe-zebra.



Fonte: Do autor, 2017.

Foi realizado também um gráfico de proporção de sobrevivência no qual mostrou que os embriões que tiveram a maior taxa de sobrevivência através de uma curva de comparação onde os pontos 1, 3 e 4 os quais apresentaram uma proporção de sobrevivência de 55%. Dentre os outros, os pontos medianamente críticos foram os e os pontos 2 e 5 obtiveram uma proporção de sobrevivência de 70% e o ponto mais crítico foi o ponto 6 tendo 5% de sobrevivência ao fim da exposição, sendo diferente significativamente em relação aos outros pontos conforme mostrado na Figura 6.

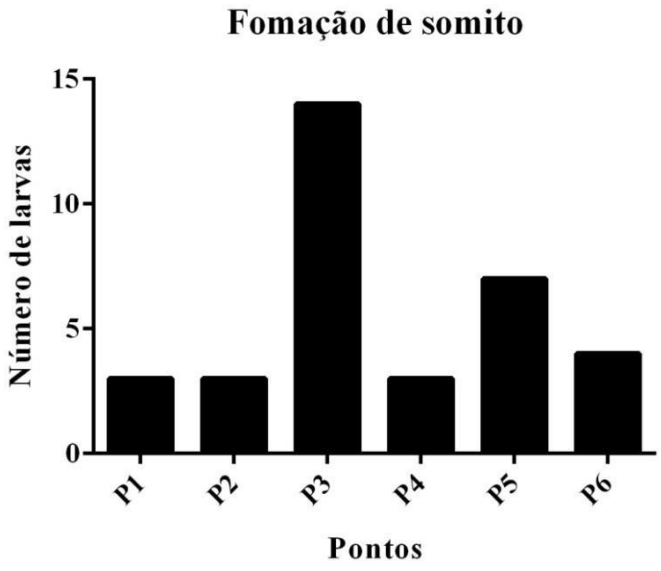
Figura 6: Proporção de sobrevivência de diferentes pontos do Rio Linha Torrens em embriões de peixe- zebra.



Fonte: Do autor, 2017.

Também foi avaliada a formação de somito, que consiste em um outro parâmetro estabelecido pelo protocolo FET. Esta alteração morfológica foi observada nos embriões a partir de 48 hpf sendo que os pontos 1, 2 e 4 apresentaram 15%, o ponto 5 35%, o ponto 6 com 40% e o ponto mais crítico foi o ponto 3 com 70% (Figura 7).

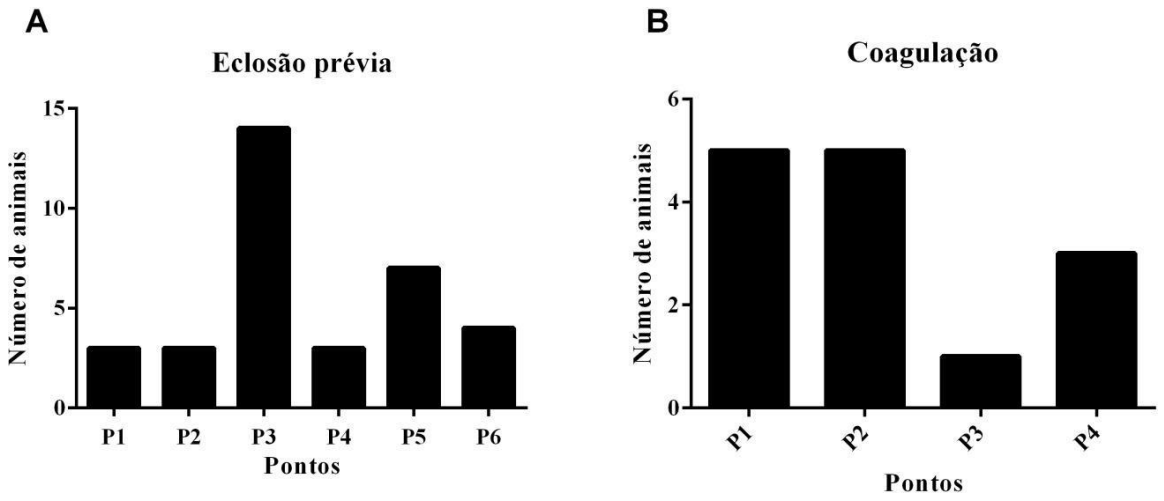
Figura 7: Formação de somito em embriões de peixe-zebra nos diferentes pontos do Rio Linha Torrens.



Fonte: Do autor, 2017.

Outro parâmetro que indica a resposta de toxicidade no desenvolvimento do peixe-zebra, foi a eclosão prévia das larvas, sendo normalmente ocorrido em 72 hpf. Entretanto, analisamos a eclosão prévia em 48 hpf, e a localização que apresentou o perfil mais crítico foi o ponto 3 localizado em um bairro onde há liberação de efluentes domésticos no rio. Os valores encontrados para o ponto 1, 2 e 4 foi de 15%, o ponto 6 de 20%, o ponto 5 35% e por fim o ponto 3 com 70% (Figura 8A). O último parâmetro avaliado foi a coagulação dos embriões fertilizados sendo observado nos pontos 1 e 2 (25%) no ponto 3 (5%) e no ponto 4 (15%). (Figura 8B)

Figura 8: Eclosão prévia e coagulação observada em embriões de peixe-zebra expostos em diferentes pontos do Rio Linha Torrens.



Fonte: Do autor, 2017.

Foi também realizado um PAR, um Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats que foi realizado nos seis pontos da bacia hidrográfica do Rio Linha Torrens, os resultados obtidos a partir desse protocolo foi representado conforme a tabela abaixo.

Tabela 1: Protocolo de avaliação rápida dos pontos amostrados no Rio Linha Torrens, Morro da Fumaça, SC.

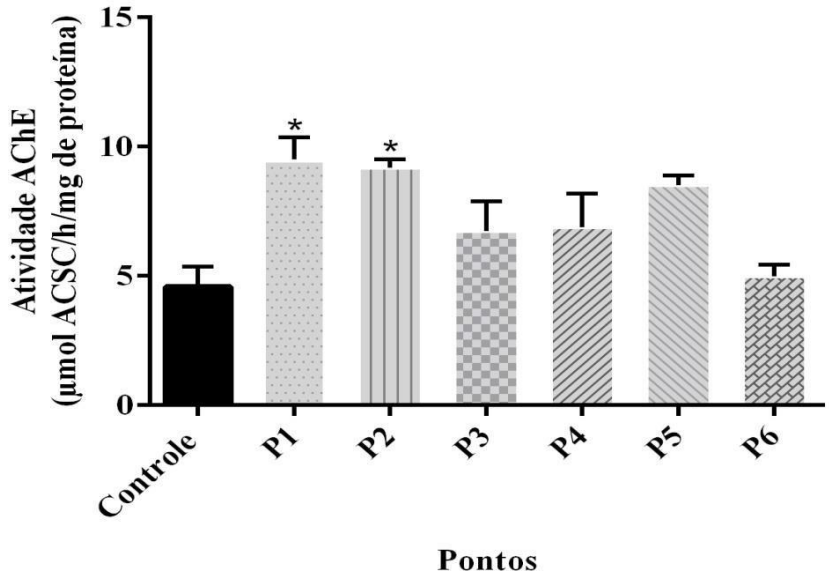
Pontos	Somatório final
P1	63
P2	38
P3	27
P4	30
P5	30
P6	29

Fonte: Do autor, 2017.

Esses somatórios finais apresentados refletem o nível de preservação das condições ecológicas dos trechos em estudo sendo que o trecho onde de 0 a 40 representa trechos “impactados”, de 41 a 60 trechos “alterados” e acima de 61 trechos “naturais” (CALLISTO et al., 2002). Pelas pontuações encontradas o único ponto que é considerado natural é o ponto 1, com um somatório de 63 e todos os outros pontos analisados são considerados alterados. (Tabela 1).

Também foi avaliada a atividade enzimática da acetilcolinesterase nas larvas de zebrafish sendo que houve uma diferença significativa nos pontos 1 (p=0,01) e 2 (p=0,01) em relação ao controle sendo que houve também diferença significativa no ponto 6 em relação aos pontos 1 (p= 0,02) e ponto 2 (p= 0,03)(Figura 9).

Figura 9: Efeito da toxicidade aguda de diferentes pontos do Rio Linha Torrens sobre a atividade da enzima AChE em embriões de peixe-zebra. Os resultados representam média ± desvio padrão de dois diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores da atividade enzimática estão expressos em µmol ACSC/h/mg de proteína, respectivamente. *p<0,05; em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).



Fonte: Do autor, 2017.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o ecossistema aquático é o receptor final de contaminantes liberados no ambiente (DOMINGOS, 2006). Segundo a resolução n° 357, de 2005 do CONAMA define que o efeito tóxico agudo é um efeito deletério aos organismos vivos causados por agentes físicos ou químicos, usualmente letalidade ou alguma manifestação que a antecede, em um curto período de exposição. Uma vez que a análise de parâmetros morfológicos utilizando os embriões de peixe-zebra, foi demonstrado que os pontos mais críticos são os pontos mais urbanizados e afetados de forma indireta pela mineração de carvão e que apresentam alta mortalidade, como em um estudo realizado por Borges (2009) no Rio Urussanga utilizando os organismos bioindicadores *Artemia* sp. e *Daphnia magna*, demostrou que apenas um dos três pontos estudados tiveram uma elevada concentração letal. Embora este estudo tenha sido realizado em outro organismo bioindicador podemos observar que houve uma maior taxa de mortalidade nos embriões e larvas nos pontos 6 (95%), nos pontos 1, 3 e 4 a taxa de mortalidade foi de 55% e nos pontos 2 e 5 foi 30%. Outro estudo realizado por Geremias e colaboradores (2003), na região carbonífera de Criciúma/SC, constatou-se uma expressiva mortalidade em *Artemia* sp., às águas de rio atingidas pelos efluentes de mineração de carvão, podendo sugerir que a toxicidade seria decorrente da acidez e da presença de metais pesados nas amostras, sugerindo que a elevada mortalidade do ponto 6 seria decorrente desses efluentes de mineração. Um estudo realizado por Andrade (2004) demonstrou que os embriões são mais sensíveis a efluentes do que adultos e que houve alteração na eclosão prévia dos embriões quando expostos a efluentes industriais, podendo justificar a elevada taxa de eclosão nos embriões do ponto 3, seguido do ponto 5.

No presente estudo, a elevada mortalidade observada no ponto 6, a foz do Rio Linha Torrens que se encontra com o Rio Urussanga poderia estar associado à concentração de metais pesados e geração de drenagem ácida de mina (DAM) assim como o contato com efluentes oriundos da atividade carbonífera, conforme proposto por Muniz e Oliveira-Filho (2006). Segundo o estudo de Sonnack e colaboradores, (2015), contaminações por metais pesados encontradas no ambiente, mesmo que em baixas concentrações, podem alterar os neuromastos dos embriões e também gerarem dano aos neurônios motores primários, secundários e alteração comportamental, dificultando assim, o desenvolvimento dos embriões. Os resultados deste estudo mostrou que houve uma alteração morfológica na formação de somito, que é a estrutura formadora da coluna vertebral e da musculatura segmentar nos embriões, sendo esta mais evidente nos pontos 3 e 5, ou seja, que estes pontos podem

apresentar maiores concentrações de metais, já que existe o descarte de efluentes industriais e urbanos nestes pontos. Outro estudo realizado por Carvalho e colaboradores, (2017), utilizando *Ceriodaphnia dúbia* em exposição simultânea ao alimento e ao meio aquoso, mostrou que houve uma toxicidade crônica pela redução na taxa reprodutiva dos invertebrados aquáticos de água doce, comprometendo assim o ecossistema aquático, demonstrando que os metais podem interferir no sistema biológico. Apesar do objetivo deste estudo ter sido verificar a viabilidade e alterações morfológicas nos embriões, as concentrações de metais podem interferir em todo o sistema biológico.

No ponto 1, que é a nascente do rio, existe uma área de plantação agrícola próximo a nascente e uma possível explicação para a alteração nos níveis de AChE nos pontos 1 e 2 pode ser relacionada a presença de agrotóxico. Já existem alguns estudos mostrando que inseticidas e pesticidas alteram a atividade da AChE (KAVITHA; RAO, 2008, PERKINS; EVERETT; SCHLENK, 2010, KAIS et al., 2015). E pelo fato do ponto 2 se encontrar próximo a nascente a alteração pode ser apresentada como reflexo das alterações na nascente. Por ser uma área rural ainda, mesmo que haja mineração de areia atualmente neste ponto. Clorpirifos e organofosforados são inseticidas amplamente utilizados em todo mundo, que provocam sérios problemas ambientais (FU et al., 2013). Estudos realizados com a utilização de agrotóxicos e inseticidas causam diferentes tipos de alterações em embriões de peixe-zebra. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), classificou alguns tipos de inseticidas e pesticidas, sendo os organofosforados e os carbamatos (clorpirifos, carbofuran, por exemplo) como moderadamente tóxicos, e altamente tóxicos metamidofos, metomil, por exemplo. Vários estudos relataram que clorpirifos possuem uma variedade de efeitos, incluindo bioquímicos e alterações histopatológicas (XING et al., 2012), estresse oxidativo (KAVITHA; RAO, 2008; FUENTES et al., 2015), genotoxicidade (ALI et al., 2009), toxicidade reprodutiva (FARAG et al., 2010; NISHI; HUNDAL, 2013) e alterações endócrinas (VISWANATH et al., 2010).

A alteração da atividade da AChE tem sido amplamente utilizada como biomarcador de neurotoxicidade por amostras ambientais ou substâncias puras em diferentes tecidos e modelos animais sensíveis a determinados níveis de contaminação aquática (PERKINS; EVERETT; SCHLENK, 2000; ARUFE et al., 2007; DE DOMENICO et al., 2013; FAN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). Em relação à análise da atividade da AChE, existem alguns estudos como Kavitha e Rao, (2008), Perkins, Everett e Schlenk, (2010), que relacionam a alteração da atividade da AChE a agrotóxicos ou poluentes, como no estudo realizado por Kais et al. (2015), com Aroclor 1254, 2,3-Benzofurano, Bisfenol A, clorpirifos, *Paraoxon-*

Methy, Quinolina e cloreto de metil mercúrio. Através dos resultados encontrados neste estudo, foi possível verificar que a atividade da enzima estava aumentada nos pontos 1 e 2, indicando que nestas localizações possíveis contaminantes como organofosforados e carbamatos e até alguns metais pesados que podem estar aumentando a atividade da AChE total em embriões de peixe-zebra, o que indica uma menor quantidade do neurotransmissor ACh na fenda sináptica. Pela existência de atividade agrícola principalmente no ponto 1, a nascente do rio e o ponto 2 estão alterados. Segundo Azevedo e Chasin (2003), certos agentes, como inseticidas fosforados, agem sobre a atividade da AChE inibindo-a, gerando assim um acúmulo de acetilcolina nos locais onde ela é liberada normalmente. Segundo Silva (2015), a acumulação de ACh, gerado pela inativação da AChE provoca uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos, muscarínicos e nicotínicos interrompendo a neurotransmissão, causando então uma intoxicação por inibidores da AChE. Outra explicação pode ser o fato de que alguns pontos não mostraram um nível de toxicidade elevada, devido ao fato de que substâncias tóxicas com um peso molecular elevado são mais difíceis de passar pela córion do embrião (BRAUNBECK et al., 2015).

Um estudo realizado por Berha e colaboradores (2002), mostrou que a ACh, tem um papel crucial nas sinapses central e neuromuscular, e que através de uma mutação no gene de dor do peixe-zebra, cessando assim a hidrólise de ACh, manifestando que os embriões são inicialmente móveis mas, subsequentemente desenvolveram paralisia. Estes embriões mutantes apresentaram defeitos na formação e inervação de fibras musculares e os neurônios sensoriais morrem prematuramente, mostrando que quando os níveis da atividade da AChE estão alterados, os embriões podem rapidamente sofrer alterações na movimentação e n comportamento já que não conseguiram movimentar-se e forragear em busca de alimento, o que pode ser uma explicação para a diminuição no ponto 6 em relação aos pontos 1 e 2.

Não existem muitos estudos na região carbonífera com relação à análise dos ecossistemas aquáticos, mas existem diversos estudos sobre a recuperação ambiental na região carbonífera como o estudo de Volpato, De Menezes e Da Silva, (2017). Existem estudos relacionados à ecologia de alguns animais que vivem na região carbonífera como o realizado por Harter-Marques et al. (2010) sobre dispersão de sementes em uma área em recuperação após a mineração de carvão em Siderópolis. Um estudo realizado por Zocche e colaboradores (2014), com anfíbios mostrando haver elevadas concentrações de metais pesados e estresse oxidativo em *Hypsiboas faber*, mostrando que *H. faber* é sensível aos poluentes presentes em resíduos de mineração de carvão. Ouve um estudo sobre dano ao

DNA e níveis de metais pesados em morcegos insetívoros na região carbonífera de Santa Catarina (ZOCCHE et al., 2010).

No sentido de melhor compreender os mecanismos relacionados as causas toxicológicas induzidas de forma distinta entre as amostras das localidades pesquisadas, estudos futuros são de extrema relevância no sentido de identificar possíveis compostos envolvidos nessa alteração da atividade da AChE, alterações morfológicas e mortalidade. Existem diversas atividades mineradoras ocorrendo ao longo do Rio Linha Torrens como a mineração de areia, mineração de pirita e a mineração de carvão. Sendo assim, possíveis compostos presentes nas amostras das diferentes localidades avaliadas podem ter alterado a atividade da AChE nos pontos 1 e 2 como mostrado no estudo realizado por Ensibi e Yahia (2017), que verificou um aumento na atividade da AChE em copépodos planctônicos através do cloreto de cádmio. Outro estudo realizado por Yousefi Babadi et al. (2014) mostrou um aumento na AChE em cérebro de ratos devido à altas concentrações de manganês. Foi também encontrado um aumento na atividade da AChE em mexilhões expostos a cádmio e chumbo (BAINY et al., 2005). Portanto, não podemos excluir a possibilidade de que alguns metais poderiam estar modulando a atividade da AChE.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a toxicidade embrionária pode ser decorrente dos agrotóxicos que poderiam estar presentes nos pontos 1 e 2 que tiveram uma maior letalidade, assim como o aumento na atividade da AChE sendo usada como um indicador de neurotoxicidade refletindo assim a qualidade ambiental, mesmo considerando o PAR o ponto 1 sendo natural e o ponto 2 alterado. E em relação a eclosão prévia encontrada no ponto 3 pode ter sido decorrente da liberação de efluente urbano

As alterações morfológicas encontradas nos embriões/larvas de peixe-zebra podem estar relacionadas ao uso de agrotóxicos, de efluentes domésticos e industriais podendo alterar a morfologia do peixe-zebra, possivelmente levando a uma alteração locomotora, o que foi visto no presente estudo através da formação dos somitos.

Neste contexto, o presente estudo visa contribuir na compreensão da atual situação do ecossistema aquático e a necessidade de estudos futuros sobre a biota aquática e as interações presentes.

REFERÊNCIAS

ALI, D. et al. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish Channa punctatus (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 650-656, 2009.

ALVARES, C.A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANDRADE, R. M. S. L. de. Efeitos da exposição de peixe zebra, Danio rerio, a um efluente têxtil. 2006. 100p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Zoologia e Antropologia-Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2004.

ANGLADE, P.; LARABI-GODINOT, Y. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse: perspectives for future researches. **Biomedical research**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2010.

ANNIBELLI, M.B. **Mineração de areia e seus impactos sócio-econômico ambientais**. In: Congresso Nacional do Conselho Nacional de Pesquisa e Pós Graduação em Direito - CONPEDI. Manaus: p.4205-4217, 2006.

ARUFE, M. I. et al. Cholinesterase activity in gilthead seabream (Sparus aurata) larvae: characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. **Aquatic toxicology**, v. 84, n. 3, p. 328-336, 2007.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo: RiMa, 2003. 322 p.

BAINY, A.C.D. et al. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the Perna perna mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 35-39, 2006.

BARKER, G. R.I; WARBURTON, E. C. Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. **Learning & Memory**, v. 16, n. 1, p. 8-11, 2009.

BENASSI, J. C. et al. Evaluation of remediation of coal mining wastewater by chitosan microspheres using biomarkers. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 51, n. 4, p. 633-640, 2006.

BEHRA, M. et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2002.

BITAR, O. Y. **Avaliação da recuperação de áreas degradadas por mineração na região metropolitana de São Paulo**. 1997. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - EPUSP, São Paulo, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistrs**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Lei nº 6567/1978, de 24 de setembro de 1978.** Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6567.htm> Acesso em: 20 ago. 2017

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 010,** de 06 de dezembro de 1990. Licenciamento Ambiental de Extração Mineral da classe II. Publicada *no* Diário Oficial da União (D.O.U.) de 28 de dezembro de 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 357,** de 17 de março de 2005. Classificação dos corpos de água e padrões de lançamento de efluentes. Publicada *no* Diário Oficial da União (D.O.U.) de 18 de março de 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430**, de 13 de maio de 2011. Padrões de Lançamentos de Efluentes. Publicado no Diário Oficial da União (D.OU.) de 16 maio de 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **População estimada.** Disponível em:< http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=421120 > Acesso em: 12 ago. 2016.

BRASIL. **Decreto Presidencial de 14 de setembro de 2000**. APA da Baleia Franca. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomasbrasileiros/marinho/unidadesde-conservacao-marinho/2236-apa-da-baleia-franca>. Acesso em: 23 set. 2016.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia (MME). **Relatório técnico 46- Perfil da Fluorita.** 2009. Disponível em <http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P28_RT46_Perfil_da_Fluorita.pdf/e6daf01b-abb8-487f-a478-960bf3682a6c> Acesso em: 21 ago. 2017

BOURRACHOT, S. et al. Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (Danio rerio). **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 1-11, 2014.

BRAUNBECK, T. et al. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. **Alternatives to Animal Experimentation**, v.22, n.2, p.87–102, 2005.

BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.

BROFFT, J. E. et al. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 764-769, 2002.

CALLISTO, M. et al. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de hábitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 14, n.1, p. 91 – 98, 2002.

CAMPOS, M. L. et al. Impactos no solo provocados pela mineração e depósito de rejeitos de carvão mineral. **Revista de Ciências Agroveterinárias,** v. 9, n. 2, p. 198-205, 2010.

CARVALHO, H. D. R. T. Avaliação socioeconômica e ambiental em uma área impactada pela extração do carvão: estudo de caso no bairro Colonial em Criciúma-SC. (Dissertação de mestrado). **Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense**, 2008.

CHAVES, A. P. Os problemas do carvão geral e do carvão brasileiro em particular. In: SOARES, P. S.M. et al. **Carvão brasileiro: tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008, p. 13-24.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CESTESB). (2012) **Relatório de qualidade das águas superficiais do Estado de SP.** Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB

CRUZ, S.M da. **As minas de fluorita em Morro da Fumaça: um olhar sobre o trabalho mineiro e o cotidiano familiar.** 2015. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação do Curso de Geografia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, Brasil. 2015.

DAMMSKI, A.P. et al. **Zebrafish Manual de Criação em Biotério.** 1 ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. 107p.

DE DOMENICO, E. et al. Biological responses of juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax) exposed to contaminated sediments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 97, p. 114-123, 2013.

DIAS, L. E; MELLO, J. W. V. **Recuperação de áreas degradadas**. 2 ED. Viçosa: Folha de Viçosa, 1998, 257p.

DOMINGOS, F.X.V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 2006. 118p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Paraná - UFP, Curitiba, 2006.

DOIG, L. E.; LIBER, K. Nickel partitioning in formulated and natural freshwater sediments. **Chemosphere**, v. 62, n.6, p. 968–979, 2006.

DNPM, Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). **Sumário Mineral, 2002**. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/> Acesso em: 21 ago. 2017

DNPM, Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). **Anuário Mineral, 2010.** Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/assuntos/ao-publico/anuario-mineral/arquivos/ANUARIO_MINERAL_2010.pdf/view> Acesso em: 21 ago. 2017

DNPM, Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). **Sumário Mineral, 2014.** Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/fluortita-sumario-mineral-2014/@@download/file/FLUORITA_2013.pdf> Acesso em: 24 ago. 2017.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38-44, 2009.

ELLMAN G. L, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v. 7, p.88-95, 1961.

ENSIBI, C.; YAHIA, M.N.D. Toxicity assessment of cadmium chloride on planktonic copepods Centropages ponticus using biochemical markers. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 83-88, 2017.

ESCH, C de. et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 6, p. 545-553, 2012.

FAN, Y. et al. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat? **Hormones and behavior**, v.64, n. 4, p. 598-604, 2013.

FARAG, A. T. et al. Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 80-85, 2010.

FU, Y.et al. Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on cytochrome P450 contents and enzyme activities in common carp gills. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 94, p. 28-36, 2013.

FULTON, M. H.; KEY, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37-45, 2001.

GEREMIAS, R. et al. Use of coal mining waste for the removal of acidity and metal ions Al (III), Fe (III) and Mn (II) in acid mine drainage. **Environmental Technology**, v. 29, n.8, p. 863-869, 2008.

GEREMIAS, R. **Utilização de rejeito de mineração de carvão como adsorvente para redução da acidez e remoção de íons de metais em drenagem ácida de mina de carvão.** 2009, 121f. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, Florianópolis, 2009.

GEREMIAS, R. et al. Remediation of coal mining wastewaters using chitosan microspheres. **Environmental Technology**, v. 24, n. 12, p. 1509-1515, 2003.

GERLAI, R. A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 3-4, 2011.

GERLAI, R. Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research? **Behavioural brain research**, v. 207, n. 2, p. 223-231, 2010.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (Danio rerio). **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 85, n. 4, p. 752-761, 2006.

GIOVANNINI, M. G.; LANA, D.; PEPEU, G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 119, p. 18-33, 2015.

HARTER-MARQUES, B. et al. Seed dispersal by birds on artificial perches in reclaimed areas after surface coal mining in Siderópolis municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

HEEMANN, R; COSTA, J.C. F. Emprego da tecnologia de *backfilling* na gestão de resíduos sólidos da mineração de carvão. In: SOARES, P.S.M. et al. **Carvão brasileiro: tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. p.57-74.

KAIS, B. et al. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.21, p. 16329-16339, 2015.

KAVITHA, P.; RAO, J. V. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, Gambusia affinis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 192-198, 2008.

KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LAGGNER, C. et al. Chemical informatics and target identification in a zebrafish phenotypic screen. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 144-146, 2012.

LELLES, L. C. **Avaliação qualitativa de impactos ambientais oriundos da extração de areia em cursos d'água.** 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal - Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, 2004.

MARTINS, A.A. **Sócio-ecomomia do carvão em Santa Catarina: uma contribuição ao estudo de sua trajetória**. 2005. 186f. Dissertação (Mestrado em Economia). Programa de Pós-Graduação em Economia - Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, Florianópolis, 2005.

MUNIZ, D.H. F.; OLIVEIRA- FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.4, n. 1/2, p. 83-100, 2006 .

NAGEL R. DarT: the embryo test with the zebrafish Danio rerio -a general model in ecotoxicology and toxicology. **Alternatives to Animal Experimentation**, v.19, p.38–48, 2002**.**

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Restoration of aquatic ecosystems: science, technology, and public policy.** Washington D.C: National Academies Press, 1992. 552p.

NISHI, K.; HUNDAL, S.S. Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 732-738, 2013.

NOGUEIRA, G.R.F. **A extração de areia em cursos d'água e seus impactos: proposição de uma matriz de interação**. 2016. 74p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária) - Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, 2016.

OECD Guideline for Testing of Chemicals, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD**, Paris, France, 2013.

OMS. **The WHO Recommended Classification of Pesticides By Hazard And Guidelines To Classification 2004**. Organização Mundial da Saúde, 2004.

PERKINS, J.R.; EVERETT, J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological Sciences**, v.53, n.2, p. 308-315, 2000.

QIAN, L. et al. Embryotoxicity and genotoxicity evaluation of sediments fromYangtze River estuary using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.5, p. 4908-4918, 2015.

RODRIGUES, A. P. et al. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: accumulation and multibiomarker responses. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 454-463, 2013.

SAMPAIO, J.A.; ANDRADE, M.C.; BALTAR, C.A.M. Fluorita. In: DA LUZ, A.B.; LINS, F.A.F. **Rochas e Minerais Industriais**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2005, 487-505.

SANTA CATARINA. SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE RECURSOS HÍDRICCOS DO ESTADO DE SANTA CATARINA (SIRHERSC) **Bacia Hidrográfica do Rio Urussanga**. Disponível em:<http://www.aguas.sc.gov.br/a-bacia-rio-urussanga/bacia-hidrografica-rio-urussanga> Acesso em: 19. Out. 2017.

SAURABH, C. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science Total Environmental** v. 347, p. 46–52, 2005.

SASOWSKY, I.D.; FOOS, A.; MILLER, C.M. Lithic controls on the removal of iron and remediation of acidic mine drainage. **Water Research**, v. 34, p. 2742-2746, 2000.

SCHOLZ, S. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 506-530, 2013.

SCHOLZ, S.; MAYER, I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 293, n. 1, p. 57-70, 2008.

SILVA, E.; CEREJEIRA, M.J.. Avaliação do risco de pesticidas individuais e suas misturas em águas de superfície. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p.32-42, 2012.

SILVA, S. M. S.da. **Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento**. 2015. Dissertação (Mestrado).

SILVEIRA, K. F. **Impactos Ambientais No Canal Principal Da Bacia Do Rio Linha Torrens, Município De Morro Da Fumaça-SC.** 2011. 79f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação do Curso de Geografia) Universidade do Extremo Sul Catarinense- (UNESC) Criciúma, Brasil. 2011.

SIPES, N.S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 3, p. 256-267, 2011.

SOARES, P.R.L. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. **Chemospere** v.161 p. 412-421. 2015.

SONNACK, L. et al. Effects of metal exposure on motor neuron development, neuromasts and the escape response of zebrafish embryos. **Neurotoxicology and teratology**, v. 50, p. 33-42, 2015.

STROHSCHOEN, A.A.G. et al. Estudo preliminar da qualidade da água dos rios Forqueta e Forquetinha, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

SUEN, M.F.K. et al. Assessments of the effects of nicotine and ketamine using tyrosine hydroxylase-green fluorescent protein transgenic zebrafish asbiosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 177-185, 2013.

SVENSSON, B. M. et al. Artemia salina as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.102, p. 309-321, 2005.

VENTURA, A.L.M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)** v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VIEIRA, E.G.; REZENDE, E.N. Mineração de areia e meio ambiente: é possível harmonizar? **Revista do Direito Público**, v. 10, n. 3, p. 181-212, 2015.

VISWANATH, G. et al. Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 120, n. 1, p. 22-29, 2010.

VOLPATO, S. B.; DE MENEZES, C. T. B.; DA SILVA, J. V. F. Recuperação ambiental de ecossistemas aquáticos em regiões estuarinas: Estudos aplicados para o tratamento de sedimentos contaminados pela drenagem ácida de mina na bacia hidrográfica do Rio Urussanga/Sc. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, 2017.

WEBER, P. et al. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. **Microchemical Journal**, v.106, p. 61–66, 2013.

WILKINSON, R.N.; JOPLING, C.; VAN EEDEN, F. J. Zebrafish as a model of cardiac disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 124, p. 65-91, 2014.

XING, H. et al. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 377-383, 2012.

YOUSEFI BABADI, V. et al. The toxic effect of manganese on the acetylcholinesterase activity in rat brains. **Journal of toxicology**, v. 2014, 2014.
ZIRGER, J.M. et al. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Gene Expression Patterns**, v. 3, n. 6, p. 747-754, 2003.

ZOCCHE, J. J. et al. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. **Environmental research**, v. 110, n. 7, p. 684-691, 2010.

ZOCCHE, Jairo José et al. Heavy-metal content and oxidative damage in Hypsiboas faber: The impact of coal-mining pollutants on amphibians. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 66, n. 1, p. 69-77, 2014.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do Perfil de Toxicidade de Diferentes Pontos do Rio Linha Torrens Utilizando Embriões de Peixe-Zebra *Danio rerio***", registrada com o protocolo nº **062/2016-1**, sob a responsabilidade de **Eduardo Pacheco Rico**, junto à equipe: **Miriam da Conceição Martins, Samira Leila Baldin, Amanda Floriano Ghisi, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **14/06/2016**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/06/2016 a 01/04/2017
Espécie/linhagem/raça	Peixes (adultos como matrizes)
Nº de animais	170
Peso/Idade	0,005g / 0- 96 horas pós fertilização 0,650g / 4 meses
Sexo	-
Origem	Rio Linha Torrens

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Assessment Toxicity of Different Locations of the Torrens Line River Using Zebrafish *Danio Rerio* Embryos**".
Protocol number: **062/2016-1**
Principal Investigator: **Eduardo Pacheco Rico**
Researchers: **Miriam da Conceição Martins, Samira Leila Baldin, Amanda Floriano Ghisi, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 14 de junho de 2016.

Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

ANEXO II – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE TOXICIDADE DE DIFERENTES PONTOS DO RIO LINHA TORRENS UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA Danio rerio.**", registrada com o protocolo nº **035/2017-1 (Adendo do protocolo 062/2016-1)**, sob a responsabilidade de **Eduardo Pacheco Rico**, junto à equipe: Samira Leila Baldin, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **04/04/2017**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12/04/2017 a 11/04/2018
Espécie/linhagem/raça	Peixes adultos como matriz
Nº de animais	170
Idade/Peso	0-96 hpf/ 4 meses 0,005g/ 0,650g
Gênero	-
Origem	Rio Linha Torrens

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**ASSESSMENT TOXICITY OF DIFFERENT LOCATIONS OF THE TORRENS LINE RIVER USING ZEBRAFISH Danio rerio EMBRYOS.**"
Protocol number: **035/2017-1 (Adendo do protocolo 062/2016-1)**
Principal Investigator: **Eduardo Pacheco Rico**
Researchers: **Samira Leila Baldin, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 04 de abril de 2017.

Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

ANEXO III – QUADRO 1 DO PAR

Descrição do Ambiente	
Localização:	
Data de Coleta:____/___/___	*Hora da Coleta: _____*
Tempo (situação do dia):	
Modo de coleta (coletor):	
Tipo de Ambiente: Córrego ( ) Rio ( )	
Largura média:	
Profundidade média:	
Temperatura da água:	

PARÂMETROS	PONTUAÇÃO ***4 pontos***	***2 pontos***	***0 ponto***
1.Tipo de ocupação das margens do corpo d'água (principal atividade)	*Vegetação natural*	*Campo de pastagem/Agricultura/ Monocultura/ Reflorestamento*	*Residencial/ Comercial/ Industrial*
2. Erosão próxima e/ou nas margens do rio e assoreamento em seu leito	*Ausente*	*Moderada*	*Acentuada*
3. Alterações antrópicas	*Ausente*	*Alterações de origem doméstica (esgoto, lixo)*	*alterações de origem industrial/ urbana (fábricas, siderurgias, canalização, retilinização do curso do rio)*
4. Cobertura vegetal no leito	*Parcial*	*Total*	*Ausente*
5. Odor da água	*Nenhum*	*Esgoto (ovo podre)*	*óleo/industrial*
6. Oleosidade da água	*Ausente*	*Moderada*	*Abundante*
7. Transparência da água	*Transparente*	*turva/cor de chá-forte*	*opaca ou colorida*
8. Odor do sedimento (fundo)	*Nenhum*	*Esgoto (ovo podre)*	*óleo/industrial*
9. Oleosidade do fundo	*Ausente*	*Moderado*	*Abundante*
10. Tipo de fundo	*pedras/cascalho*	*Lama/areia*	*cimento/canalizado*

ANEXO IV – QUADRO 2 DO PAR

PARÂMETROS	**PONTUAÇÃO**			
	5 pontos	*3 pontos*	*2 pontos*	*0 ponto*
11. Tipos de fundo	*Mais de 50% com habitats di versificados; pedaços de troncos submersos; cascalho ou outros habitats estáveis.*	*30 a 50% de habitats diversificados; habitats adequados para a manutenção das populações de organismos aquáticos.*	*10 a 30% de habitats diversificados; disponibilidade de habitats insuficiente; substratos freqüentemente modificados.*	*Menos que 10% de habitats di versificados; ausência de habitats óbvia; substrato rochoso instável para fixação dos organismos.*
12. Extensão de rápidos	*Rápidos e corredeiras bem desenvolvidas; rápidos tão largos quanto o rio e com o comprimento igual ao dobro da largura do rio.*	*Rápidos com a largura igual à do rio, mas com comprimento menor que o dobro da largura do rio.*	*Trechos rápidos podem estar ausentes; rápidos não tão largos quanto o rio e seu comprimento menor que o dobro da largura do rio.*	*Rápidos ou corredeiras inexistentes.*
13. Freqüência de rápidos	*Rápidos relativamente freqüentes; distância entre rápidos dividida pela largura do rio entre 5 e 7.*	*Rápidos não freqüentes; distância entre rápidos di vidida pela largura do rio entre 7 e 15.*	*Rápidos ou corredeiras ocasionais; habitats formados pelos contornos do fundo; distância entre rápidos di vidida pela largura do rio entre 15 e 25.*	*Geralmente com lâmina d'água "lisa" ou com rápidos rasos; pobreza de habitats; distância entre rápidos di vidida pela largura do rio maior que 25.*
14. Tipos de substrato	*Seixos abundantes (prevalecendo em nascentes).*	*Seixos abundantes; cascalho comum.*	*Fundo formado predomina nte-mente por cascalho; alguns seixos presentes.*	*Fundo pedregoso; seixos ou lamoso.*
15. Deposição de lama	*Entre 0 e 25% do fundo coberto por lama.*	*Entre 25 e 50% do fundo coberto por lama.*	*Entre 50 e 75% do fundo coberto por lama.*	*Mais de 75% do fundo coberto por lama.*
16. Depósitos sedimentares	*Menos de 5% do fundo com deposição de lama; ausência de deposição nos remansos.*	*Alguma evidência de modificação no fundo, principalmente como aumento de cascalho, areia ou lama; 5 a 30% do fundo afetado; suave deposição nos remansos.*	*Deposição moderada de cascalho novo, areia ou lama nas margens; entre 30 a 50% do fundo afetado; deposição moderada nos remansos.*	*Grandes depósitos de lama, maior desenvolvi-mento das margens; mais de 50% do fundo modificado; remansos ausentes devido à significativa deposi ção de sedimentos.*
17. Alterações no canal do rio	*Canalização (retificação) ou dragagem ausente ou mínima; rio com padrão normal.*	*Alguma canalização presente, normalmente próximo à construção de pontes; evidência de modificações há mais de 20 anos.*	*Alguma modificação presente nas duas margens; 40 a 80% do rio modificado.*	*Margens modificadas; acima de 80% do rio modificado.*
18Características do fluxo da s águas	*Fluxo relativamente igual em toda a largura do rio; mínima quantidade de substrato exposta.*	*Lâmi na d'água acima de 75% do canal do rio; ou menos de 25% do substrato exposto.*	*Lâmi na d'água entre 25 e 75% do canal do rio, e/ou maior parte do substrato nos "rápidos" exposto.*	*Lâmi na d'água escassa e presente apenas nos remansos.*

19. Presença de mata ciliar	*Acima de 90% com vegetação ripária nativa, incluindo árvores, arbustos ou macrófitas; mínima evidência de deflorestamento; todas as plantas atingindo a altura "normal".*	*Entre 70 e 90% com vegetação ripária nativa; deflorestamento evidente mas não afetando o desenvolvimento da vegetação; maioria das plantas atingindo a altura "normal".*	*Entre 50 e 70% com vegetação ripária nativa; deflorestamento óbvio; trechos com solo exposto ou vegetação eliminada; menos da metade das plantas atingindo a altura "normal".*	*Menos de 50% da mata ciliar nativa; defloresta-mento muito acentuado.*
20 Estabilidade das margens	*Margens estáveis; evi dência de erosão mínima ou ausente; pequeno potencial para problemas futuros. Menos de 5% da margem afetada.*	*Moderadamente estáveis; pequenas áreas de erosão freqüentes. Entre 5 e 30% da margem com erosão.*	*Moderadamente instável; entre 30 e 60% da margem com erosão. Risco elevado de erosão durante enchentes.*	*Instável; muitas áreas com erosão; freqüentes áreas descobertas nas curvas do rio; erosão óbvia entre 60 e 100% da margem.*
21. Extensão de mata ciliar	*Largura da vegetação ripária maior que 18 m; sem influência de atividades antrópicas (agropecuária, estradas, etc.).*	*Largura da vegetação ripária entre 12 e 18 m; mínima influência antrópica.*	*Largura da vegetação ripária entre 6 e 12 m; i nfluência antrópica intensa.*	*Largura da vegetação ripária menor que 6 m; vegetação restrita ou ausente devido à atividade antrópica.*
22. Presença de planta saquáticas	*Pequenas macrófitas aquáticas e/ou musgos distribuídos pelo leito.*	*Macrófitas aquáticas ou algas filamentosas ou musgos distribuídas no rio, substrato com perifiton.*	*Algas filamentosas ou macrófitas em poucas pedras ou alguns remansos, perifiton abundante e biofilme.*	*Ausência de vegetação aquática no leito do rio ou grandes bancos macrófitas (p.ex. aguapé).*