

**UNIVERSIDADE VILHA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE**  
**ECOSSISTEMAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE *Lithobates catesbeianus* (RÃ-  
TOURO) AO FERRO, MANGANÊS E MINÉRIO DE FERRO**

**ALEXANDRA CAROLINE DA SILVA VERONEZ**

**VILA VELHA – ES**  
**MARÇO/2013**

**UNIVERSIDADE VILHA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE**  
**ECOSSISTEMAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE *Lithobates catesbeianus* (RÃ-  
TOURO) AO FERRO, MANGANÊS E MINÉRIO DE FERRO**

Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ecologia de  
Ecosistemas, para a obtenção de  
grau de Mestre em Ecologia.

**ALEXANDRA CAROLINE DA SILVA VERONEZ**

**VILA VELHA - ES**  
**MARÇO/2013**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

V549a Veronez, Alexandra Caroline da Silva.

Avaliação da exposição de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) ao ferro, manganês e minério de ferro / Alexandra Caroline da Silva Veronez. – 2013.

50 f. : il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Anfíbio - Estudo de casos. 2. Ferro-manganês. 3. Ferro no organismo. 4. Indicadores biológicos. I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 333.7

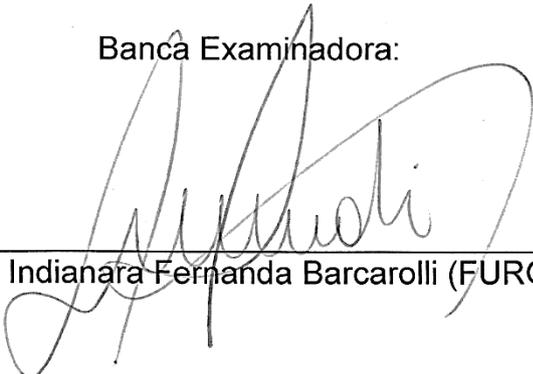
ALEXANDRA CAROLINE DA SILVA VERONEZ

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE *Lithobates catesbeianus* (RÃ-TOURO) AO FERRO, MANGANÊS E MINÉRIO DE FERRO

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção de grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 26 de março de 2013,

Banca Examinadora:



---

Dra. Indianara Fernanda Barcarolli (FURG)



---

Dr. Alessandro Coutinho Ramos (UWV)



---

Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes (UWV) - Orientadora

Dedico aos meus pais, Angela e David, por toda demonstração de amor, carinho e apoio na realização de mais esta etapa da minha vida.

*A Força*

*“A força não provém de uma capacidade física  
e sim de uma vontade indomável.”*

Mahatma Gandhi

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me dado força para enfrentar as adversidades no decorrer deste trabalho e da minha vida. E por ter me abençoado com mais esta conquista.

À minha orientadora Dra. Adriana Regina Chippari Gomes, pela confiança, paciência e amizade, e por apoiar e acreditar neste trabalho. Obrigada.

À minha família pelo incentivo, apoio, carinho e compreensão. Ao meu namorado que esteve sempre ao meu lado, pela sua compreensão, amor e carinho.

À Sra. Tereza e ao Sr. Fernando, do ranário em João Neiva, que doaram os girinos para realização do trabalho.

À Dra. Indianara F Barcarolli, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, pelo acompanhamento e ajuda nas análises de metais. À Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, da Universidade Estadual de Londrina – UEL, pela ajuda nas análises de metais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas que contribuíram para minha formação acadêmica, e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos colegas do Laboratório de Ictiologia Aplicada – Lab Peixe, que contribuíram de maneira direta ou indireta com o trabalho, e que me acompanharam na realização deste trabalho, Vinicius Dadalto, Graciele Venturoli, Priscila Pavione, Lara Schayder, Caroliny Patricio, Luciana Nascimento, Hevilim, Laila, Taciana, Thiago, Barbara. Obrigada pelo apoio e carinho. Aos amigos que mesmo longe contribuíram com muito apoio e carinho.

Aos colegas do Laboratório Ciências Farmacêuticas que contribuíram de alguma forma para o andamento do trabalho. Aos funcionários do complexo biopráticas que se demonstraram muito disponíveis.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTAS DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 FERRO.....	1
1.2 MANGANÊS.....	3
1.3 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES.....	4
1.4 ANUROFAUNA COMO BIOINDICADOR.....	5
1.5 METAMORFOSE.....	6
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
3.1 Objetivo geral.....	9
3.1.1Objetivos específicos.....	9
<b>4. MATERIAL E METÓDOS.....</b>	<b>10</b>
4.1 LOCAL DE COLETA.....	10
4.2 ACLIMATAÇÃO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	10
4.3 ANÁLISES GENOTÓXICAS, BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS..	11
4.3.1 Ensaio cometa.....	11
4.3.2 Teste do micronúcleo.....	12
4.3.3 Ferritina.....	12
4.3.4 Enzimas.....	12
4.3.5 Análises morfológicas.....	13
4.3.6 Bioconcentração de ferro.....	14
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
5.1 QUALIDADE DA ÁGUA.....	15
5.2 ANÁLISES GENOTÓXICAS.....	16
5.2.1 Ensaio cometa.....	16
5.2.2 Teste do micronúcleo.....	19
5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	20
5.3.1 Ferritina.....	20
5.3.2 Enzima Glutathiona S-Transferase (GST).....	22
5.3.3 Enzima Catalase.....	23
5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	25
5.5 Bioacumulação de ferro.....	28
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>7 REFERÊNCIA.....</b>	<b>31</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Especiação do ferro no ambiente aquático (Bury et al., 2011).....	2
Figura 2.	Estágios de desenvolvimento da metamorfose de girinos segundo tabela simplificada de Gosner (1960).....	7
Figura 3.	Índices de danos no DNA (ID) nos eritrócitos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos, por meio do teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	17
Figura 4.	Frequência média de eritrócitos micronucleados em <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	19
Figura 5.	Ferritina em <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	21
Figura 6.	Atividade da enzima GST em girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	23
Figura 7.	Atividade da enzima Catalase em <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	24
Figura 8.	Bioacumulação de ferro de <i>Lithobates catesbeianus</i> , expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p<0,05$ ).....	28

## LISTA DE TABELAS

<p>Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água de aclimação e dos experimentos de exposição de <i>Lithobates catesbeianus</i> aos diferentes tratamentos: T1=minério de ferro; T2= Fe EDTA; T3= Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os valores estão expressos em mediana. SM=Sem medida.....</p>	15
<p>Tabela 2. Classes de danos no DNA nos eritrócitos de <i>Lithobates catesbeianus</i>, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's (<math>p&lt;0,05</math>).....</p>	18
<p>Tabela 3. Distribuição dos estágios de desenvolvimento em girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i>, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle.....</p>	26
<p>Tabela 4. Biometria de <i>Lithobates catesbeianus</i>, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's (<math>p&lt;0,05</math>).....</p>	27

## RESUMO

Veronez, Alexandra Caroline da Silva, Universidade Vila Velha – ES, março de 2013. **Avaliação da exposição de *Lithobates catesbeianus* (rã touro) ao ferro, manganês e minério de ferro.**

Orientadora: Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes

Jazidas de minério de ferro são importantes fontes de metais, como ferro e manganês. A mineração e os processos de fundição do metal fazem com que ocorram alterações no ciclo desses metais. Os anfíbios são dependentes fisiologicamente das condições ambientais, tornando estes organismos vulneráveis às alterações que ocorrem no ambiente, sendo considerados excelentes bioindicadores ecotoxicológicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do minério de ferro durante a fase de metamorfose da espécie *Lithobates catesbeianus*, por meio de análises genotóxicas (ensaio cometa e teste do micronúcleo), bioquímicas (GST e CAT), assim como a concentração do metal no organismo e o acompanhamento das alterações morfológicas. Estas mesmas análises também foram realizadas com os girinos expostos ao ferro e ao manganês, com o intuito de observar isoladamente o efeito de cada um deles na espécie *L. catesbeianus*, visto que esses dois metais são os mais abundantes na composição do minério de ferro. A exposição dos girinos aos tratamentos, consistiu em 6 indivíduos para cada tratamento em triplicatas, sendo adicionadas as concentrações de 3,79mg/L de minério de ferro (T1), 3,81mg/L de Fe-EDTA (T2), 8,79mg/L de cloreto de manganês (T3) e mais um grupo controle (sem contaminante). Os animais foram mantidos nestas condições por 30 dias. Os indivíduos expostos aos tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram aumento significativo no índice de danos ao DNA quando comparados ao grupo controle, assim como aumento na incidência de micronúcleos eritrocitários e na atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST). A quantificação da ferritina plasmática e da atividade da enzima catalase (CAT) foram maiores apenas nos girinos expostos ao minério de ferro (T1). Os girinos expostos aos três tratamentos tiveram seu desenvolvimento afetado, no entanto o minério de ferro afeta em uma proporção um pouco menor. A bioacumulação de ferro corporal nos tratamentos T1 e T2 foram significativas em relação ao controle. Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que o minério de ferro e os elementos que fazem parte de sua composição (Fe e Mn) causam alterações genotóxicas e bioquímicas. O ferro é bioacumulado no organismo, porém a exposição a essas substâncias não provocam alterações significativas no processo de metamorfose dos girinos da espécie *Lithobates catesbeianus*.

**Palavras chave:** anfíbios, danos genotóxicos, danos bioquímicos, metamorfose, bioacumulação

## ABSTRACT

Veronez, Alexandra Caroline da Silva, Universidade Vila Velha – ES, março de 2013. **Exposure assessment of *Lithobates catesbeianus* (bullfrog) to iron, manganese and iron ore.**

Adviser: Dr. Adriana Regina Chippari-Gomes

Iron ore deposits are important sources of metals such as iron and manganese. The mining and metal casting processes make changes in the composition of these metals. Amphibians are very sensitive to environmental changes, therefore these organisms should be considered excellent ecotoxicological biomarkers. This study aimed to evaluate the toxicity of iron ore during the metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*, through genotoxic analysis (comet assay and micronucleus test), biochemical (CAT and GST enzymes), as well as the bioconcentration of iron and monitoring of morphological changes. These same tests were performed with the tadpoles exposed to iron and manganese, in order to observe the isolated effect of each metal in *L. catesbeianus*, since these two metal are the most abundant in the composition of iron ore. The exposure of tadpoles to treatments consisted of six animals for each treatment in triplicate, in the concentration of 3,79 mg/L of iron ore (T1), 3,81 mg/L Fe-EDTA (T2) 8,79mg/L manganese chloride (T3) and one control group (no contaminant). The animals were kept under these conditions for 30 days. Individuals exposed to treatments T1, T2 and T3 showed a significant increase in the rate of DNA damage compared to the control group, also an increase was observed in incidence of micronuclei erythrocytic and in enzyme activity of Glutathione S-transferase (GST). Quantification of plasma ferritin and catalase activity (CAT) were higher only in tadpoles exposed to iron ore (T1). Tadpoles exposed to all three treatments had its development affected, however iron ore in a slightly lower proportion. The bioaccumulation of body iron in T1 and T2 were significant higher when compared to the control. Based on these results it can be stated that the iron ore and the elements that are part of its composition (Fe and Mn) cause genotoxic and biochemical changes. Iron is bioaccumulated in the body, but exposure to these substances do not cause observable morphological changes in the process of tadpole metamorphosis of the species *Lithobates catesbeianus*.

Key words: amphibians, genotoxic damage, biochemical damage, metamorphosis, bioaccumulation

## 1. INTRODUÇÃO

Jazidas de minério de ferro são importantes fontes de metais, como ferro e manganês, e também metais associados no ambiente (cobre, zinco e magnésio). A mineração e os processos de fundição do metal faz com que ocorram alterações no ciclo desses metais (ferro e manganês). Em ambientes temperados, estudos têm mostrado que a mineração de minério de ferro e seus resíduos têm gerado elevados níveis de íons dissolvidos e particulados em suspensão, alterando a química da água e a biodisponibilidade dos metais (Pereira, et al., 2008).

Ao longo de décadas a extração do minério de ferro tem sido intensificada com o intuito de suprir a demanda das indústrias de siderurgia para produção de aço (Luz e Lins, 2004). O Brasil é o segundo maior produtor de minério de ferro. No estado do Espírito Santo encontram-se duas grandes empresas, que juntas produzem 47,25 milhões de toneladas de ferro. As atividades envolvidas nesse empreendimento são a de beneficiamento do minério de ferro e a de escoamento para os portos (Lima e Pedrozo, 2001; Luz e Lins, 2004).

O transporte e a deposição nos pátios de estocagem são os processos que causam a dissipação dos particulados de minério de ferro. Tecnologias vêm sendo usadas para impedir que as partículas de minério de ferro sejam espalhadas durante esses processos, porém mesmo assim não são suficientes, causando muitos transtornos para saúde da população, além de afetar à fauna e flora (Lima e Pedrozo, 2001; Luz e Lins, 2004). Populações que vivem em torno de usinas de mineração de ferro ou de pátios de estocagem sofrem com o excesso de particulado que é transportado pelo ar, tendo como consequência danos à saúde da população, causando doenças respiratórias (Miranda, 2009; Oliveira, 2007). Esse particulado pode causar também danos aos vegetais, devido à sua deposição sobre as folhas e ao ambiente aquático também por conta da deposição e acúmulo neste ambiente.

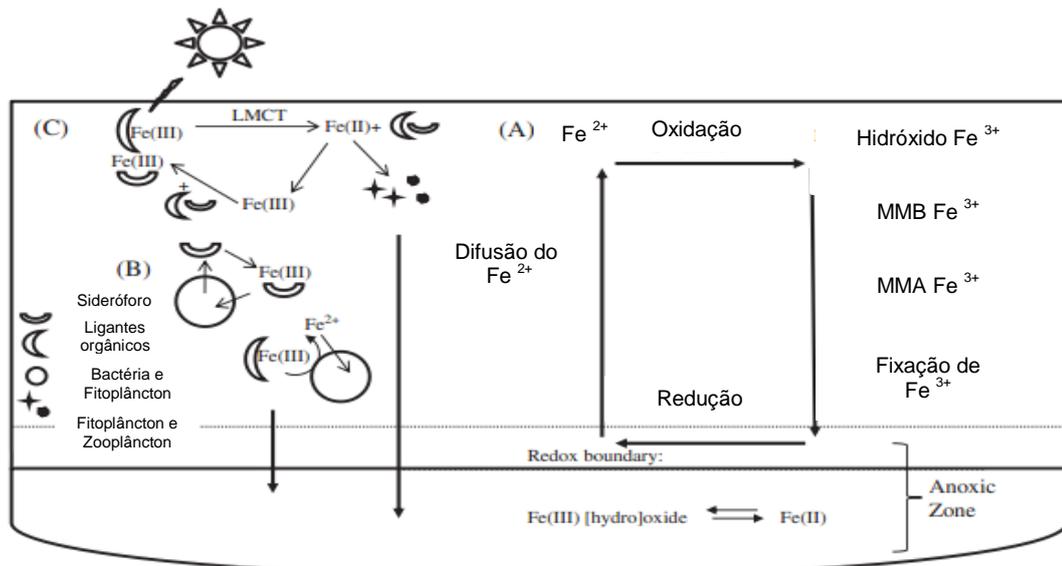
### 1.1 FERRO

O ferro é um dos elementos mais abundantes do planeta, depois do oxigênio, silício e magnésio. Este elemento é facilmente oxidado, portanto, raramente é encontrado na sua forma elementar (Fe), sendo primeiramente oxidado

na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e posteriormente na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). O ferro férrico é propenso a formar hidróxidos de ferro que são insolúveis (Lima e Pedrozo, 2001).

A especiação do ferro na água ocorre pela oxidação deste elemento na coluna d'água com a influência e associação de micro e macro organismos. No ambiente aquático, o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado para  $\text{Fe}^{3+}$  (tendo o  $\text{Fe}^{3+}$  massa molecular baixa), resultando na forma hidróxido férrico com massa molecular alta, conseqüentemente ocorre precipitação, e deposita-se no sedimento. No entanto, associado aos organismos bentônicos há o favorecimento da conversão de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  pela reação de redox, e com isso, difunde-se novamente pela coluna d'água (Figura 1A) (Bury et al., 2011). A difusão/retorno do  $\text{Fe}^{2+}$  no corpo d'água superior ocorre, por exemplo, por bioperturbação, ressuspensão física e ressurgência (Lima e Pedrozo, 2001; Bury et al., 2011).

Outra forma que favorece a permanência do ferro na coluna d'água é através dos sideróforos que são peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade pelo ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e que são produzidos por bactérias e fitoplâncton (Figura 1B), tornando esta forma de ferro mais solúvel e disponível para estes organismos. Quando ocorre a ligação entre  $\text{Fe}^{3+}$  e sideróforos, durante exposição à luz solar, ocorre a transferência de elétrons (Figura 1C), liberando o  $\text{Fe}^{2+}$  que pode ser oxidado ou retornar a ligação com microrganismos (Bury et al., 2011).



**Figura 1.** Especiação do ferro no ambiente aquático (Bury et al., 2011).

O ferro é essencial à vida, sendo importante na transferência de oxigênio, na função imunológica e está relacionado na síntese de DNA (Berg et al., 2008; Pan et al., 2009; Laks, 2010). Porém o excesso do ferro pode ser prejudicial, desencadeando uma gama de reações de radicais livres, e com isso, provocando danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Berg et al., 2008; Laks, 2010).

Para ser armazenado de forma segura o excesso de ferro, os animais desenvolveram sistemas sofisticados. Como por exemplo, a transferrina, que transporta o ferro no soro sanguíneo e se liga aos receptores específicos localizados na membrana celular, e inicia a entrada do ferro na célula, uma vez no citosol o ferro combina-se com a apoferritina para formar a ferritina, que é uma proteína que atua como estoque celular de ferro (Umbelino e Rossi, 2006) e é encontrada principalmente no fígado e rins (Berg et al., 2008).

A metabolização do ferro ocorre em um círculo fechado que envolve transferrina circulante, a medula óssea, os eritrócitos e os macrófagos retículo-endoteliais, sendo o excesso do ferro armazenado no fígado. No músculo, este metal é incorporado pela mioglobina. A proteína de globina se integra à maioria do ferro para facilitar o transporte de oxigênio (Pan et al., 2009; Laks, 2010).

## **1.2 MANGANÊS**

O manganês é um dos elementos extraído nas jazidas de minério de ferro (Pereira, et al., 2008). Este pode existir no ambiente aquático no estado oxidado, sendo a forma solúvel  $Mn^{+2}$  e na forma oxidada  $Mn^{+4}$ , sendo a forma solúvel e predominante neste ambiente. A participação deste metal no processo redox faz com que ocorra a liberação da parte solúvel do sedimento para coluna d'água (Martins e Sperling, 1997).

Este metal traço é essencial para animais e seres humanos, afetando principalmente o cérebro, por estar envolvido na neurotransmissão sináptica. A obtenção do manganês pode ser através da dieta ou através da absorção pelos pulmões. Deficiência de manganês na dieta, faz com as funções epiléticas aumente, afetando assim a homeostase de manganês no cérebro, e alterando a atividade neural. Porém, o manganês também atua como um agente tóxico para o cérebro, pois este metal tem atividade pró-oxidantes. Concentrações anormais de manganês

no cérebro, especialmente nos gânglios basais estão associados com distúrbios neurológicos semelhantes à doença Parkinson (Takeda, 2003; Vieira et al., 2012).

### **1.3 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES**

O biomonitoramento é uma atividade preventiva e é uma maneira de observar como os organismos respondem às perturbações antropogênicas e naturais que ocorrem no ecossistema. Os parâmetros biológicos são avaliados através de testes com espécies sensíveis e tolerantes às perturbações que ocorrem, estes são denominados de bioindicadores (Buss et al., 2003).

Os indicadores biológicos “ideais”, além de serem espécies sensíveis e tolerantes a perturbações, devem possuir as seguintes características: apresentar distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; preferencialmente possuir tamanho grande; apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida; ter possibilidade de uso em estudos em laboratório (Buss et al., 2003).

Algumas análises que são usadas como ferramentas para averiguar a toxicidade dos contaminantes e as respostas adaptativas a estressores nos bioindicadores, são denominadas de biomarcadores (Amorim, 2003; Buss et al., 2003; Zagotto e Bertoletti, 2006). Estes podem ser evidenciados como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais. Exemplos são as atividades das enzimas Glutathione S-transferase e Catalase, e os testes genotóxicos: Micronúcleo e Ensaio Cometa (Hansen, 2003; Ramsdorf, 2007).

O teste do micronúcleo permite analisar danos no DNA, que ocorre durante o processo de mitose em células dos eritrócitos, quando os organismos são expostos a contaminantes (Ramsdorf, 2007; Ferraro, 2009). O ensaio cometa detecta danos no DNA, que são causados por alguns agentes tóxicos, tem aplicabilidade em todo organismo e tipo de célula eucariótica, é um teste barato, e é considerado adequado para o monitoramento ambiental (Tice et al., 2000). Esta técnica pode avaliar também o reparo do DNA. O cometa é formado da fragmentação do material genético que está fora do núcleo, os fragmentos são obtidos a partir da passagem de corrente elétrica (Silva et al., 2000).

As enzimas Glutathione S-transferase (GST) e Catalase (CAT) são muito usadas. A primeira participa nos processos de desintoxicação, catalisando a conjugação de vários compostos e interage no esforço oxidativo em determinadas

situações na qual o organismo se encontra (Camargo e Martinez, 2006). A Catalase (CAT) que tem caráter antioxidante é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) produzido no metabolismo celular (Martins et al., 2005). Durante a oxidação de ácidos graxos, o peróxido de hidrogênio é produzido como sub-produto. A catalase irá agir na degradação do peróxido de hidrogênio, sendo usada como biomarcador importante para grupos de substâncias carcinogênicas no ambiente (Martins et al., 2005).

Outra análise muito usada é a bioacumulação de substâncias tóxicas nos organismos. Essa é uma medida direta que quantifica quanto de uma substância, normalmente metais, foram acumulados no organismo. Vários são os organismos que podem ser usados como bioindicadores, dentre eles encontram-se bivalves, peixes e anfíbios (Zagatto e Bertoletti, 2006).

#### **1.4 ANUROFAUNA COMO BIOINDICADOR**

Os anfíbios anuros vêm sendo utilizados como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos. As rãs são anfíbios pertencentes à ordem Anura, família Ranidae. Os anfíbios são animais que tem como característica a ectotermia, isto é, regulam a temperatura e o metabolismo de acordo com a variação da temperatura do ambiente. Outra característica marcante das rãs é sua dependência ao ambiente aquático nos seus processos fisiológicos, como por exemplo, realização de equilíbrio hídrico, reprodução, eliminação de excretas e defesas (Figueiredo et al., 2001; Braga e Lima, 2001; Ferreira, 2002).

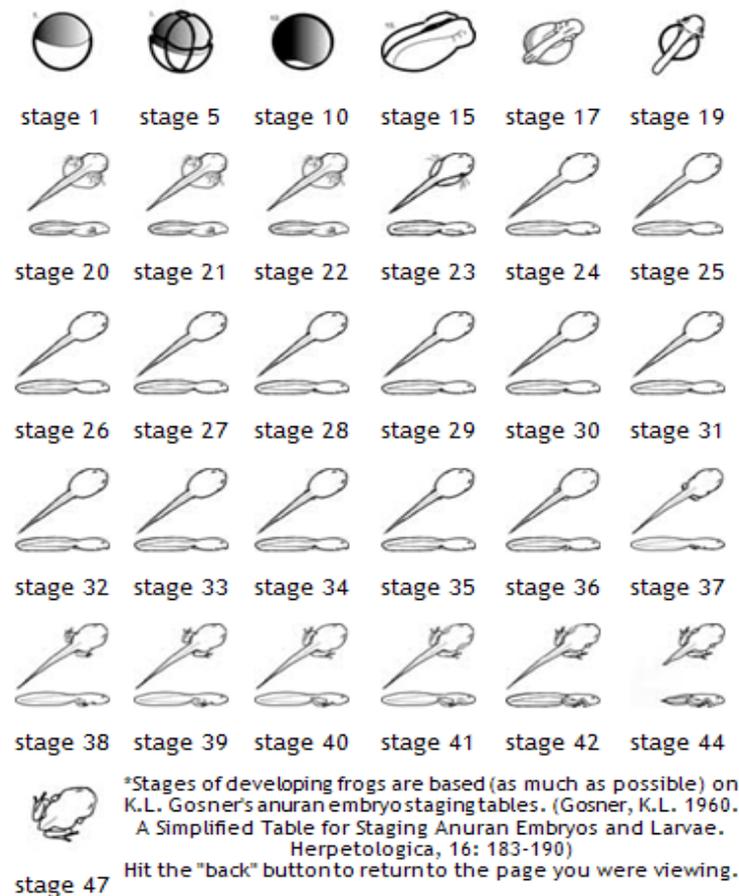
Muitos vertebrados dependem das condições ambientais para sobreviverem, como por exemplo, os anfíbios. Segundo Ferreira (2001) e Lisboa et al. (2011) seus limites podem ser geográficos, ecológicos, comportamentais e históricos, estes são influenciados pela estrutura da vegetação, umidade, heterogeneidade microambiental e disponibilidade de corpos d'água. Esta dependência com as condições ambientais faz com que estes organismos sejam vulneráveis à alterações que ocorrem no ambiente, desde pequenas perturbações até a entrada de agentes xenobióticos, podendo gerar consequências de curta e longa duração (Ferreira, 2001). Em virtude disso, estudos vêm sendo realizados para entender os efeitos das ações antrópicas nestes organismos, utilizando principalmente os estágios iniciais (Lisboa et al., 2011).

Fatores associados ao ambiente hídrico, em condições artificiais, como na ranicultura podem gerar mortalidade e prejuízo econômico para o produtor. A criação de rãs em cativeiro para fins comerciais tem sido uma prática bastante abrangente. A espécie mais utilizada na ranicultura é a *Lithobates catesbeianus* (nome popular rã-touro e anteriormente conhecida como *Rana catesbeiana*) esta espécie é caracterizada por ocupar corpos d'água permanente onde se alimenta e reproduz em taxa elevada. Uma espécie exótica, oriunda da América do Norte e introduzida no Brasil, em 1935, para diminuir a caça de espécies nativas (Rocha, 2007). A rã-touro apresentou uma grande adaptação ao novo ambiente, porém é considerada uma das cem piores espécies invasoras do mundo, devido a sua alta capacidade de competir por recursos alimentares, predação uma grande diversidade de organismos e carrear patogenicidades altamente prejudiciais a outros organismos (Rocha, 2007; Cunha e Delariva, 2009).

### **1.5 METAMORFOSE**

Os anfíbios são conhecidos por terem “duas formas de vida”, isto é, inicia o ciclo de vida no ambiente aquático, como girinos (larvas), e sofre metamorfose para se tornar adulto e assim viver em ambiente terrestre. Posteriormente os adultos retornam para água durante o período de reprodução e para depositar seus ovos (Orr, 1986; Kardong, 2011). Durante este processo o grupo passou por adaptações drásticas para possibilitar sua sobrevivência no ambiente terrestre, como por exemplo, em relação a troca gasosa, primeiramente branquial, depois cutânea que é suplementada com pulmões, na maioria das espécies (Orr, 1986; Vieira, 2010; Kardong, 2011).

Durante a metamorfose ocorrem mudanças estruturais, biológicas e fisiológicas pós-embrionária, onde se tem três mudanças de maior importância: regressão de estruturas e funções que são para sobrevivência da larva, transformação de larva para adulto e desenvolvimento de estruturas essenciais para sobrevivência dos adultos. Estas mudanças podem ser visualizadas na tabela de Gosner (1960) (Figura 2), onde é possível a visualização dos estágios de desenvolvimento. Estas alterações morfológicas são complexas e envolvem a reprogramação da expressão genética da forma larval para adulta (Orr, 1986; Vieira, 2010; Kardong, 2011).



**Figura 2.** Estágios de desenvolvimento da metamorfose de girinos segundo tabela simplificada de Gosner (1960).

A metamorfose pode ser dividida em três fases segundo Kardong (2011):

1 - **Fase pré-metamórfica:** o girino aumenta de tamanho, com pouca mudança na forma; a característica dessa fase é o surgimento dos membros posteriores.

2 - **Fase pró-metamórfica:** desenvolvimento dos membros posteriores e prossegue o crescimento do corpo.

3 - **Clímax da metamorfose:** os membros anteriores tornam-se visíveis, a boca fica mais larga e a cauda é reabsorvida, e o animal apresenta-se com o aspecto estrutural básico de um indivíduo adulto.

Durante estas fases a glândula da tiroide é responsável pelo desencadeamento da metamorfose, que tem como produto primário dois hormônios: tetraiodotirina (T4) e triiodotironina (T3). Durante a metamorfose ocorre o aumento do tamanho dessa glândula para que os hormônios sejam armazenados (Vieira, 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

A região do Espírito Santo possui pátios de estocagem e transporte de minério de ferro e manganês. Durante esses procedimentos ocorrem dispersão de partículas, as quais podem causar danos à saúde dos organismos. Apesar de existirem técnicas que impedem a dispersão de partículas de minério de ferro e meios seguros para seu transporte, acidentes envolvendo rompimento de ductos próximos ao ambiente hídrico podem ocorrer, causando contaminação do ambiente e como consequência a morte e acumulação deste minério dos organismos que habitam esta área (Lima e Pedrozo, 2001; Luz e Lins, 2004).

O estado também possui uma diversidade de anurofauna que se apresenta de maneira homogênea no estado, ocorrendo espécies endêmicas principalmente na região de Santa Teresa e Fundão. Estes organismos apresentam sensibilidade ao estarem na presença de contaminantes, como as partículas do minério de ferro que são facilmente dispersados (Ramos e Gasparini, 2004).

Os anfíbios apresentam sensibilidade a vários contaminantes sendo considerados bons indicadores de poluição ambiental. A assimilação de agentes tóxicos pode causar alterações em seu DNA, gerando assim alterações morfológicas, no caso dos anfíbios, podem ocorrer alterações no seu desenvolvimento, gerando deformidades.

O minério de ferro possui em sua composição, vários componentes e que pode variar de acordo com o local de extração do minério. Para este trabalho foi utilizado o minério de ferro, o Fe-EDTA e o cloreto de manganês, para representar a composição dos elementos mais encontrados no minério de ferro, sendo o manganês o mais encontrado na composição.

Com isso, este trabalho vem propor a hipótese de que a exposição de girinos de *Lithobates catesbeianus* ao minério de ferro, Fe-EDTA e cloreto de manganês provoca a bioacumulação desses metais e alterações genotóxicas, bioquímicas, e morfológicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do minério de ferro durante a fase de metamorfose da espécie *Lithobates catesbeianus*, por meio de análises genotóxicas (ensaio cometa e teste do micronúcleo), bioquímicas (Ferritina, GST e CAT), assim como a quantificação do metal no organismo. Estas mesmas análises serão realizadas com ferro-EDTA ( $C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$ ) e cloreto de manganês ( $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$ ), com o intuito de observar isoladamente o efeito de cada um deles na espécie *L. catesbeianus*.

#### 3.1.1 Objetivos específicos

1) Verificar a influência do minério de ferro na sobrevivência e na metamorfose, iniciando no estágio 36 de *Lithobates catesbeianus* até o estágio 47 da metamorfose (30 dias);

2) Verificar a influência do ferro-EDTA e do cloreto de manganês na sobrevivência e na metamorfose, iniciando no estágio 36 de *Lithobates catesbeianus* até o estágio 47 da metamorfose (30 dias);

3) Analisar alterações genotóxicas, iniciando no estágio 36 nos exemplares de *Lithobates catesbeianus* até o estágio 47 da metamorfose (30 dias) expostos ao minério de ferro, ao ferro-EDTA e ao cloreto de manganês.

4) Avaliar a atividade da ferritina, CAT e GST, iniciando no estágio 36 nos exemplares de *Lithobates catesbeianus* até o estágio 47 da metamorfose (30 dias) expostos ao minério de ferro, ao ferro-EDTA e ao cloreto de manganês.

5) Quantificar a bioacumulação do ferro e manganês após exposição ao minério de ferro, ao ferro-EDTA e ao cloreto de manganês.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE COLETA

Os girinos de *Lithobates catesbeianus* foram doados por ranário localizado em João Neiva-ES e transportados até o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Biopráticas/UVV). O transporte foi feito em sacos plásticos contendo água do local e oxigênio. Os indivíduos se encontravam no estágio 36 do desenvolvimento, onde ocorre o início da exteriorização dos membros posteriores (Figura 2).

### 4.2 ACLIMATAÇÃO E DESENHO EXPERIMENTAL

A aclimatação aconteceu durante 10 dias em aquários com capacidade para 40L, com troca total a cada 72h. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial farelada 55% de proteína. Após aclimatação, os animais foram transferidos para aquários de vidro contendo 10L de água e com aeração constante, e nas 24h que antecederem a transferência, foram adicionadas concentrações de minério de ferro, Fe-EDTA e cloreto de manganês à água.

Os indivíduos foram dispostos em 3 aquários por tratamento, contendo 6 indivíduos cada, n=18 por tratamento, sendo adicionadas as concentrações de 3,79mg/L de minério de ferro (T1), 3,81mg/L de Fe-EDTA ( $C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$ , sendo 0,5063 mg/L de Fe) (T2), e 8,79mg/L de cloreto de manganês ( $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$ , sendo 5,23 mg/L de Mn) (T3) e mais um grupo controle (sem contaminante). As concentrações escolhidas foram baseadas no artigo de Pereira et al (2008) que quantificou a biodisponibilidade destes elementos na lagoa de Mãe-Bá. A amostra de material sólido particulado fino de ferro - MSPFe (minério de ferro) foi doada pela Samarco mineração (ANEXO1 - tabela de composição do minério de ferro).

Estes foram mantidos nestas condições até o estágio 47 da metamorfose (cerca de 30 dias), onde foram alimentados diariamente. Os indivíduos foram observados todos os dias, para detectar mortalidade e as alterações morfológicas.

As alterações morfológicas e análise sanguínea foram avaliadas ao final de 30 dias de exposição. Durante todo o experimento também foi realizada troca total da água a cada 72h. As concentrações foram mantidas sempre constantes,

sendo reposta sempre a mesma quantidade de água com a mesma concentração. As medidas físico-químicas da água foram realizadas durante a aclimatação e o período experimental, sendo estas: oxigênio, temperatura, pH, condutividade medidos pelo Multiparâmetros YSI, amônia e nitrito, conforme Apha (1998). A água para análise do ferro e manganês dissolvido foi coletado com seringa (estéril) e filtradas com filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e adicionado 150 $\mu\text{l}$  de ácido nítrico supre puro, para preservar a amostra, as leituras foram realizadas em espectrofotometria de absorção atômica (GBS - AAS 932 Plus, no modo chama). Os resultados foram expressos em mg/L para o ferro e  $\mu\text{g/L}$  para o manganês.

### **4.3 ANÁLISES GENOTÓICAS, BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS**

A coleta de sangue foi realizada ao término do período experimental, os indivíduos foram anestesiados com cerca de 1ml de lidocaína. A coleta foi por punção do vaso caudal com seringa heparinizada. O sangue coletado foi utilizado nas técnicas do Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. Após coleta do sangue os animais foram sacrificados por secção cervical, o fígado foi retirado para realização das análises enzimáticas.

#### **4.3.1 Ensaio cometa**

A análise de fragmentos de DNA foi realizada por meio do ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata, metodologia de Silva et al. (2000) e Tice et al. (2000).

O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5%. As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente 10 $\mu\text{L}$  do sangue diluído foi misturado com 100 $\mu\text{L}$  de agarose low melting a 37°C. Em seguida as lâminas com pré-cobertura de gel foram recobertas com lamínulas para que estes espalhassem uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise e no momento do uso foi adicionado 1% de Triton X-100 e 10% DMSO por no mínimo 1h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético por 20 minutos. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 minutos. Depois desta etapa as lâminas foram neutralizadas

com tampão Tris durante 5 minutos por três vezes e então foram lavadas duas vezes com água destilada.

As lâminas foram secas por no mínimo 2h a 37°C. Após esse período foram fixadas em solução fixadora por 10 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por três vezes e secas por 2h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 minutos e coradas com solução de coloração com prata por 15 minutos a 37°C ou até a solução começar a escurecer. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes e então submersas por 5 minutos em solução stop. Passado os 5 minutos de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

A observação dos cometas foi feita com auxílio de microscópio ótico da marca LEICA GALEN III com aumento de 40X. Foram contadas 100 células de cada lâmina e os cometas foram classificados conforme forma e tamanho da cauda de 0 (não danificado) a 4 (dano máximo). O tamanho da cauda foi proporcional ao nível de fragmentos de DNA.

Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e distribuição das classes. O índice de Danos (ID) foi calculado pela multiplicação do número de nucleóides encontrados por classe pelo número da classe.

#### **4.3.2 Teste do micronúcleo**

O teste do micronúcleo foi feito por extensões sanguíneas em lâminas segundo Grisolia et al. (2005); Bücken et al. (2006). Após secas as lâminas foram fixadas por 30 minutos em álcool metílico P. A. (Metanol - 100%). Em seguida coradas com solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavadas posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi observado em microscópio ótico, e 1000 células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram contadas 2 lâminas para cada girino.

#### **4.3.3 Ferritina**

O sangue para o teste de ferritina foi centrifugado (10000 RPM) por 20min, e retirado o soro para realização da análise. O teste foi realizado através do Kit de ferritina (marca Bioclin). Pelo método de imunoturbidimetria que determina o

ponto final da concentração da ferritina através de medição fotométrica da reação antígeno-anticorpo, entre partículas de látex marcadas com anticorpo anti-ferritina e ferritina presente na amostra.

#### **4.3.4 Atividade da Glutathione S-transferase e Catalase**

Os fígados dos animais foram congelados em refrigerador (Ultra freezer CL 120 -80V), foram descongelados e homogeneizados com tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugados (13000 RPM) por 30 min a 4°C, obtendo o sobrenadante utilizado para Glutathione S-transferase (GST), Catalase (CAT) e Proteínas totais.

A atividade da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1mM GSH como substrato. A atividade da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda em 340nm, em um leitor de placa. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981).

E a Catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em 240 nm (Aebi, 1984). Foi usado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10mM e tampão TE (Tris HCL 1M e EDTA 5mM). Para leitura, 10µl de homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 900µl de tampão de reação, lidas em 240nm no espectrofotômetro.

A concentração de proteínas totais, no fígado, foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As amostras foram lidas em um espectrofotômetro em 750nm.

#### **4.3.5 Análises morfológicas**

As análises morfológicas foram avaliadas segundo Rada et al. (2007), sendo estas medidas adaptadas para o presente trabalho. Foram realizadas as seguintes medidas: comprimento do corpo, comprimento caudal, comprimento total, peso, observação do aparecimento das pernas e da presença ou não de anomalias. As medidas foram realizadas com paquímetro. Os animais foram pesados em balança de precisão.

Os estágios de desenvolvimento foram observados durante o período do experimento. Sendo estes estágios (girinos) de anfíbios anuros baseado na tabela simplificada de Gosner (1960) (figura 1).

#### **4.3.6 Bioconcentração de ferro**

A bioconcentração do ferro e do manganês foi realizada segundo Boock e Machado Neto (2005), porém com as devidas adaptações para o presente trabalho. Após a coleta do sangue e do fígado os girinos foram lavados com água deionizada – MilliQ para retirada do contaminante aderido no tecido externo. Em seguida feito o peso úmido da amostra. Em tubos falcon foram secos em estufa a 50°C, pelo período de 48h, e após este período foi feita a medida do peso seco das amostras, e após a pesagem foi adicionado à amostra ácido nítrico supra puro, no volume de 5 ml. Depois que a amostra foi completamente digerida, em seguida foi realizada a diluição 15ml de água MilliQ. As amostras foram armazenadas na geladeira, até a realização da leitura.

As leituras foram realizadas em espectrofotometria de absorção atômica (GBS - AAS 932 Plus, no modo chama). Os resultados foram expressos em mg Fe/g peso seco e µg Mn/g peso seco.

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0. Os resultados obtidos com as análises de ensaio cometa (índice de danos), teste micronúcleo, atividades enzimáticas e bioacumulação foram avaliados com teste de variância ANOVA, One Way Anova, pelo teste de Kruskal-Walis (Método de Dunn's) ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUALIDADE DA ÁGUA

A qualidade da água avaliada pelos seus parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, nitrito e pH) foram monitorados durante a aclimatação e ao longo do experimento (Tabela 1). Alterações significativas não foram observadas entre os tratamentos, exceto para a amônia. Para este parâmetro, os valores medidos no período de aclimatação foi significativamente menor do que nos tratamentos. O monitoramento da qualidade da água é importante para que não ocorram alterações no comportamento e patologias, que pode ocasionar a morte do organismo (Teixeira, 2007).

Com relação ao ferro dissolvido foi possível observar que houve um aumento significativo nos grupos T1 e T2 em relação à água da aclimatação e do grupo controle, após a adição do minério particulado fino de ferro e do Fe EDTA, embora observa-se a presença de uma pré concentração desse metal na água utilizada nos experimentos e no período de aclimatação. O manganês dissolvido foi significativo apenas no T3, após adição do  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  na água. Assim como o ferro dissolvido foi identificado a presença de manganês na água de aclimatação e do controle.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos da água de aclimatação e dos experimentos de exposição de *Lithobates catesbeianus* aos diferentes tratamentos: T1=minério de ferro; T2= Fe EDTA; T3= Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana. SM=Sem medida.

Parâmetros	Aclimatação	Controle	T1	T2	T3
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,50 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>
Temperatura (°C)	27,00 <sup>a</sup>	26,90 <sup>a</sup>	26,80 <sup>a</sup>	26,80 <sup>a</sup>	26,70 <sup>a</sup>
Condutividade (µS/cm)	99,00 <sup>a</sup>	88,90 <sup>a</sup>	86,80 <sup>a</sup>	87,60 <sup>a</sup>	97,40 <sup>a</sup>
Amônia (mg/L)	0,13 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,53 <sup>b</sup>	0,54 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>
Nitrito (mg/L)	0,001 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>
pH (unidade)	6,90 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>
Ferro Dissolvido (mg/L)	11,01 <sup>a</sup>	11,01 <sup>a</sup>	16,32 <sup>b</sup>	24,98 <sup>b</sup>	SM
Manganês Dissolvido (µg/L)	19,13 <sup>a</sup>	19,13 <sup>a</sup>	21,98 <sup>a</sup>	SM	2735,50 <sup>b</sup>

Em lagoas costeiras localizadas no Espírito Santo onde instaladas empresas de pelletização e instalações portuárias, localizadas no município de Anchieta (Espírito Santo, Ponta Ubu Site) onde o efluente é despejado em lago artificial que periodicamente transborda para lago Mãe-bá, onde foram identificados os efeitos da mineração de ferro e o processo de biodisponibilidade do metal.

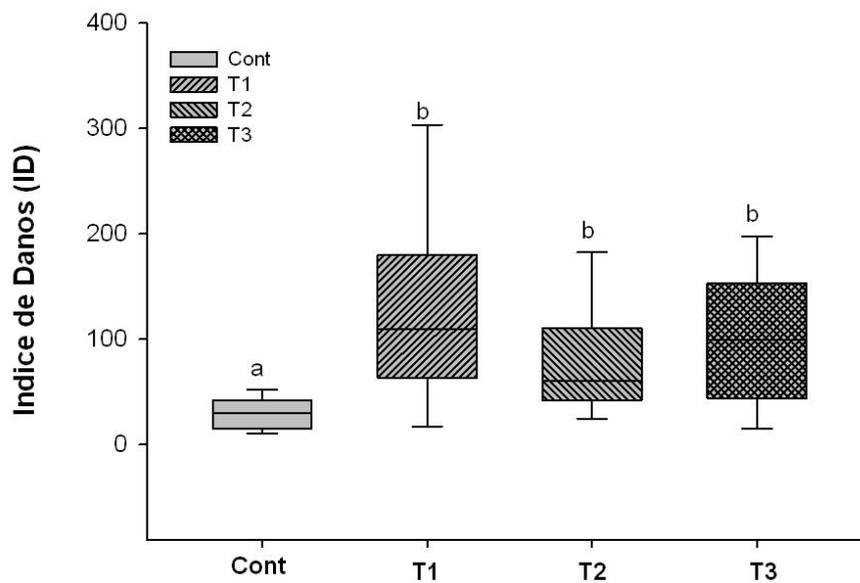
Na lagoa de Mãe-Bá foi analisada a concentração de 11 metais dissolvidos na água, dentre eles o Fe e o Mn, além da análise no sedimento e a acumulação nos invertebrados (para comprovar a deposição destes metais na lagoa), a quantidade de ferro e manganês dissolvido encontrado na água nos pontos de coleta da lagoa foram de 0,27 mg/L e 3,11 µg/L, respectivamente. E para o sedimento uma média de 33,55 mg/g e 73,28 mg/kg, respectivamente (Perreira et al., 2008). Para ferro dissolvido do presente estudo apresentou resultados com valores de dez a vinte vezes maiores que as concentrações encontradas na lagoa, mesmo sendo formas diferentes de contaminação.

A análise química da matriz do ambiente, tais como água e sedimento é a abordagem mais direta para revelar o estado de poluição de metais no ambiente, no entanto esse tipo de análise isolada não é capaz de refletir a possível toxicidade da contaminação sobre os organismos e ecossistemas (Zhou et al., 2008). Por isso a necessidade de usar os diferentes grupos de animais como indicadores biológicos, sendo os anfíbios considerados excelentes bioindicadores.

## **5.2 ANÁLISES GENOTÓXICAS**

### **5.2.1 Ensaio cometa**

A exposição dos girinos aos três tipos de contaminantes (T1=minério de ferro, T2=ferro-EDTA e T3=cloreto de manganês) provocou aumento significativo no índice de danos no DNA dos eritrócitos quando comparados ao grupo controle (figura 3). No entanto não foram observadas diferenças entre os tratamentos (T1, T2 e T3).



**Figura 3.** Índices de danos no DNA (ID) nos eritrócitos de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos, por meio do teste de Dunnett's ( $p < 0,05$ ).

Na distribuição das classes de danos no DNA, os indivíduos de *Lithobates catesbeianus*, quando expostos aos tratamentos T1, T2 e T3 não apresentaram diferença entre si nas classes 0, 2, 3 e 4. No entanto, os animais desses mesmos tratamentos apresentaram maior quantidade de fragmentos celulares nas classes 2 (danos moderados), 3 (danos pouco severos) e 4 (danos severos) quando comparados ao grupo controle (Tabela 2), e conseqüentemente uma quantidade menor de fragmentos celulares pertencentes na classe 0 (sem danos) quando comparados com os organismos do controle. Essa diferença na distribuição nas classes de danos no DNA evidencia o efeito tóxico das substâncias testadas, causando danos de intensidade maiores, como observado na incidência maior de danos nas classes 2, 3 e 4.

**Tabela 2:** Classes de danos no DNA nos eritrócitos de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

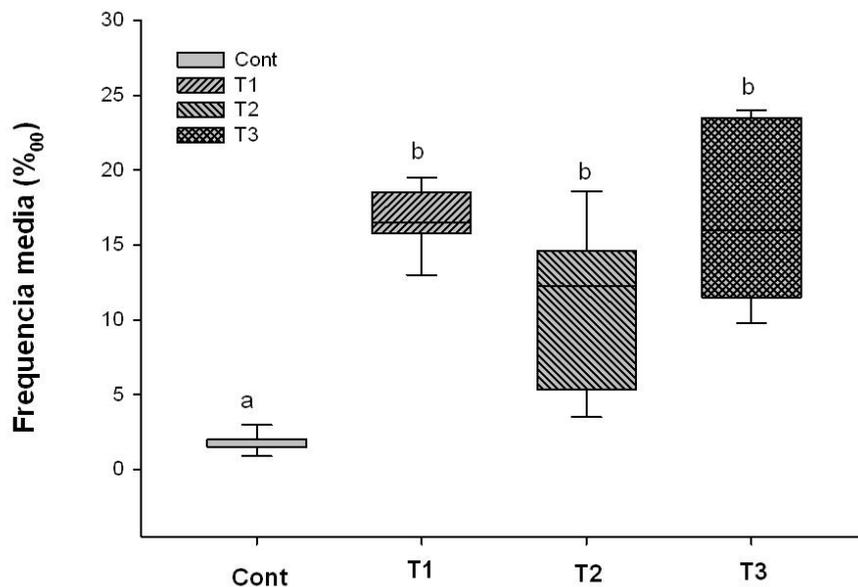
TRATAMENTOS	CLASSES DE DANOS NO DNA				
	0	1	2	3	4
<b>Controle</b>	81,75 <sup>a</sup>	18,25 <sup>b</sup>	4,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>T1</b>	14,00 <sup>b</sup>	21,00 <sup>a</sup>	12,50 <sup>b</sup>	19,00 <sup>b</sup>	1,50 <sup>b</sup>
<b>T2</b>	10,50 <sup>b</sup>	9,00 <sup>b</sup>	8,50 <sup>b</sup>	6,75 <sup>b</sup>	1,00 <sup>b</sup>
<b>T3</b>	22,00 <sup>b</sup>	19,50 <sup>b</sup>	23,50 <sup>b</sup>	6,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>

Esse aumento na indução de danos no DNA observado nos girinos de *Lithobates catesbeianus* provocado pela exposição ao minério de ferro, ferro e manganês corroboram com os demais trabalhos que afirmam que os metais e alguns pesticidas causam efeitos deletérios em células somáticas ou germinativas (Dhawan et al., 2009). Esta indução de danos no DNA (índice e frequências de danos) também foi observada em girinos da espécie *Hypsiboas faber* coletados em área de mineração de carvão quando comparados com animais de referência (Zocche et al., 2013). Os autores desse estudo relataram que os resíduos de mineração de carvão também causam alterações genotóxicas em anfíbios, além de provocarem efeitos adversos no solo, água, vegetação e animais. Veronez (2010) também observou crescente aumento de danos no DNA em exemplares de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) quando expostos ao cobre (Cu) por 30 dias.

Em virtude das rãs serem importantes predadores de pragas agrícolas acabam por entrarem em contato direto com pesticidas, sendo que em muitos destes existe em sua composição química a presença de metais, como é caso do cobre. Em estudos com os pesticidas, Feng et al. (2004) observaram aumento nos danos no DNA dos eritrócitos de rã (*Rana N. Hallowell*) nas concentrações de 0,05-0,5 mg l<sup>-1</sup> para imidacloprid, e de 5-100 mg l<sup>-1</sup> para RH-5849, em sete dias de exposição. Segundo os autores mesmo em dosagens pequenas do pesticida imidacloprid danos no DNA das rãs podem ser observados.

### 5.2.2 Teste do micronúcleo

A exposição dos girinos de *L. catesbeianus* ao minério de ferro, ferro e manganês provocou aumento significativo na frequência de células eritrocitárias com presença de micronúcleo, sendo essa frequência cerca de quinze vezes maior em relação ao grupo controle (Figura 4). Mediante a esse incremento significativo de micronúcleo, pode-se dizer que as substâncias testadas no presente trabalho causam quebras no cromossomo ou provocam uma disfunção do aparelho do fuso mitótico durante a divisão celular (Winter et al., 2007). E como consequência desse dano, o organismo pode desenvolver tumores e ter problemas reprodutivos (Moreira et al., 2010).



**Figura 4.** Frequência média de eritrócitos micronucleados em *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnett's ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Feng et al. (2004) o teste do micronúcleo demonstra ser adequado para avaliar a efeito de agentes tóxicos/genotóxicos em anfíbios. Outros trabalhos também mostram que a exposição de girinos a metais induzem um aumento significativo na quantidade de células eritrocitárias com presença de micronúcleo, como observado por Rocha et al. (2003) em girinos de *Lithobates*

*catesbeianus* (rã-touro) expostos ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) ( $2,5 \times 10^{-6}$  M), por 48 horas; por Veronez (2010) em girinos de *R. catesbeiana* expostos ao  $\text{CuSO}_4$ , por 30 dias; por Mouchet et al. (2006) em girinos de *Xenopus laevis* expostos ao cádmio (2, 10, 30  $\mu\text{g/L}$ ), por 12 dias.

Feng et al. (2004) testando dois pesticidas em girinos de *Rana N. Hallowell*, também observaram a indução na formação de micronúcleos eritrocitários, no entanto apenas em concentrações elevadas de imidacloprid ( $8 \text{ mg/l}^{-1}$  e  $32 \text{ mg l}^{-1}$ ) e RH-5849 ( $40 \text{ mg/l}^{-1}$ ). Segundo os autores a exposição de sete dias é o suficiente para observar a presença de micronúcleos em eritrócitos de anfíbios. Mas como visto no presente estudo, na exposição de 30 dias continua sendo possível observar a presença de micronúcleo.

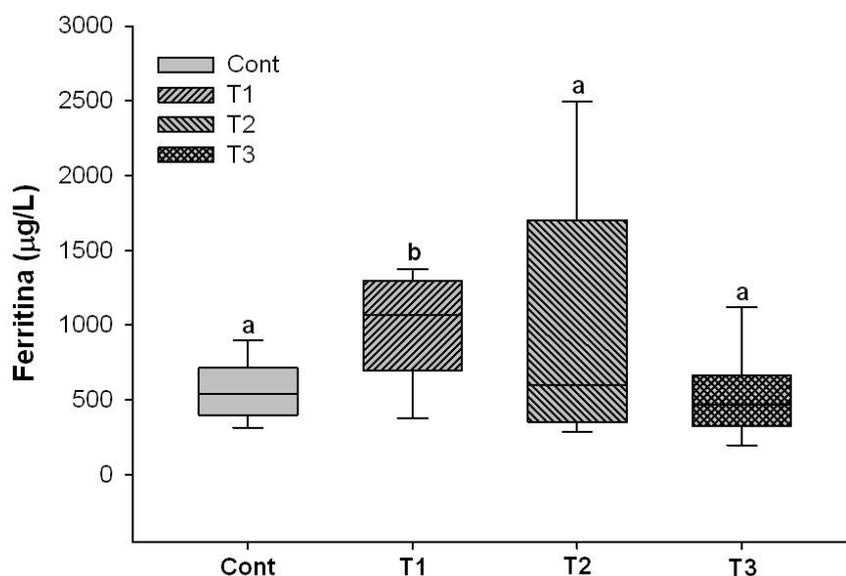
Sendo assim, o que se observou nos resultados genotóxicos obtidos no presente trabalho para os girinos é que o minério de ferro, embora em sua composição possua uma combinação de ferro, manganês e outros metais, não possui um efeito ainda mais tóxico em relação às substâncias isoladas (ferro e manganês), levando à ideia de que não há uma potencialização ou sinergismo dessas substâncias, assim como não há diferenças na toxicidade entre os metais testados (ferro e manganês).

### **5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

#### **5.3.1 Ferritina**

O ferro, assim como para o ser humano, é essencial para vida dos vertebrados. A quantidade de ferritina acumulada no sangue dos indivíduos de *Lithobates catesbeianus* apresentou-se mais elevada apenas para o T1, contendo minério de ferro, em relação aos demais tratamentos: controle, T2 e T3 (Figura 5). Uma hipótese para que o tratamento com minério de ferro tenha uma concentração maior de ferritina, é que a forma do ferro presente no minério esteja mais disponível do que no Fe-EDTA, causando assim um aumento na concentração desta proteína apenas para este tratamento. Outro motivo para não ter sido significativo o aumento no tratamento com Fe-EDTA (T2) é que houve uma variabilidade muito grande dos resultados encontrados apenas neste tratamento. A ferritina é considerada como sendo um estoque celular de ferro (Umbelino e Rossi, 2006), o aumento dessa proteína indica que o excesso de ferro no organismo está sendo mobilizado, visto

que este excesso pode ser tóxico, uma vez que facilita a formação de radicais livres (Pan et al., 2009; Laks, 2010).



**Figura 5.** Ferritina plasmática em girinos de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

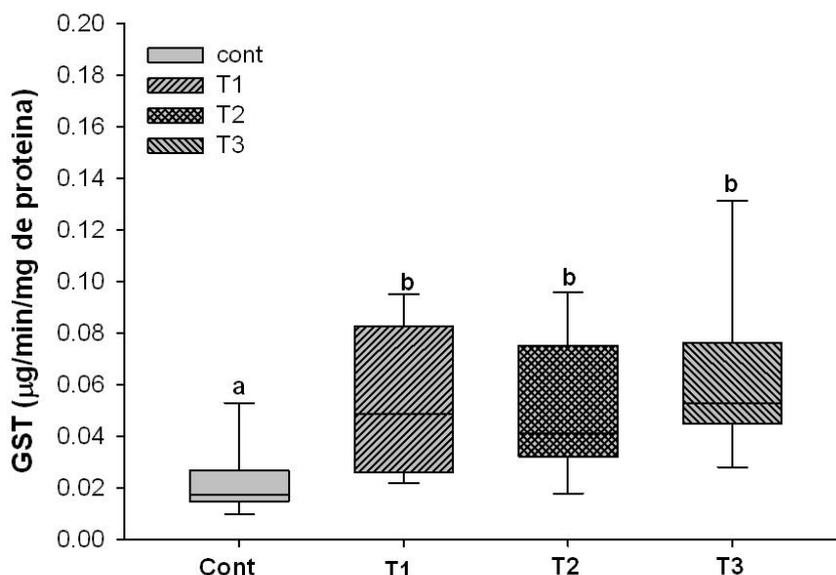
O processo de metamorfose em girinos de *Rana catesbeiana* é um dos focos de estudos com ferro realizadas por Bury et al. (2011), sendo analisada a concentração de ferro e ferritina no fígado, em diferentes estágios de desenvolvimento da metamorfose. Nesses estudos foram observadas mudanças nos picos destas variáveis nos diferentes estágios, devido ao aumento na absorção do ferro, e como consequência o aparecimento de células eritróides imaturas. Apesar de ser um elemento essencial aos organismos, seu excesso pode resultar em inúmeras alterações no metabolismo dos mesmos, por exemplo, afetando o mecanismo imunológico não específico e as respostas imunológicas mediadas por células (Osaki et al., 1974; Lima e Pedrozo, 2001; Bury et al., 2011).

Para o presente trabalho, acredita-se que a exposição de *L. catesbeianus* a uma maior quantidade de ferro disponível (T1) provocou um aumento de sua concentração no organismo, e para que houvesse um devido controle dos níveis de

ferro e sua metabolização de maneira correta no organismo dessa espécie foi necessário a produção de uma maior quantidade de ferritina.

### **5.3.2 Enzima Glutationa S-Transferase (GST)**

A GST desempenha um papel-chave na desintoxicação celular de diversos produtos xenobióticos. As enzimas protegem as células contra substâncias tóxicas, neutralizando-os e tornando o produto solúvel em água (Ezemonye e Tongo, 2010). No presente estudo, a enzima GST teve sua atividade aumentada nos tratamentos T1, T2 e T3 (Figura 6) ao final de 30 dias de exposição quando comparada ao tratamento controle. Os tratamentos demonstraram que a associação dos metais no minério de ferro ou a exposição nos contaminantes separadamente não são diferentes entre si. Para a GST a associação dos metais presentes no minério de ferro e a exposição isolada ao Fe e ao Mn não alteram a atividade da enzima. Esses resultados indicam que essas substâncias ativam o sistema de desintoxicação das células hepáticas dos girinos de *L. catesbeianus*. Resultados similares foram encontrados por Gabriel et al. (2013) na espécie de peixe *Colossoma macropomum* também expostos ao cloreto de manganês (3,88mg/L de  $Mn^{2+}$ ) por 96h.



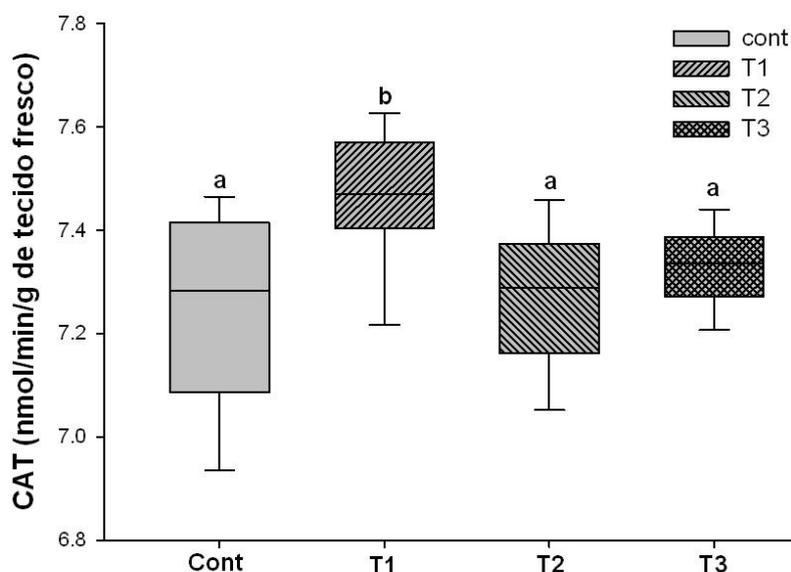
**Figura 6.** Atividade da enzima GST em girinos de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

Em estudos com um pesticida organoclorado (endosulfan) e com um organofosforado (diazinon) sobre a atividade de GST de diferentes tecidos em *Bufo regularis*, Ezemonye e Tongo (2010) observaram aumento na atividade dessa enzima nas concentrações de 0,01, 0,02, 0,03 e 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ , por 28 dias, sendo este aumento proporcional às concentrações testadas. Esses resultados corroboram com o presente trabalho no que diz respeito ao tempo de exposição. Outros trabalhos com peixes sugerem que a exposição por curtos períodos (menos que 96h) a diferentes contaminantes não são o suficiente para detectar alterações significativas na atividade da GST, sendo necessário uma exposição mais prolongada, como observado por Simonato et al (2008) em exemplares de *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel do óleo diesel, que observaram aumento significativo após 15 dias.

### 5.3.3 Enzima Catalase (CAT)

A catalase é uma das enzimas que atuam no sistema de defesa do organismo, atuando na remoção do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) metabolizando-o em  $\text{O}_2$  e água (van Der Oost et al., 2003), produzido durante a biotransformação dos

xenobióticos. No presente estudo, observa-se que a catalase teve sua atividade aumentada apenas no tratamento T1 quando comparado ao controle e aos outros tratamentos: T2 e T3 (Figura 7). Neste caso, observa-se que tanto o ferro quanto o manganês isolados não induziram um aumento do sistema de defesa dos girinos de *L. catesbeianus*, representado neste caso pela ação da enzima CAT – uma enzima antioxidante. No entanto a associação desses metais junto aos outros componentes do minério de ferro proporcionou o aumento da atividade dessa enzima. Paulino et al. (2012) propõem que a ausência da atividade da CAT também pode ser explicada pelo aumento da atividade de outras enzimas como a GPx (Glutathiona Peroxidase) ou por outras formas de defesa. Essa situação pode ter ocorrido nos girinos expostos ao ferro e ao manganês, explicando assim a ausência na alteração da CAT no fígado desses animais.



**Figura 7.** Atividade da enzima Catalase em *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

A metamorfose em anfíbios é caracterizada pela remodelação de tecidos e mudanças drásticas na estrutura e função do corpo, causando alterações na atividade das enzimas. A catalase e superóxido desmutase (SOD), desempenham um papel importante durante o processo de metamorfose de anuros. Estudo

realizado por Gaupale et al. (2012), no sistema olfativo de rã (*Microhyla ornata*), identificou aumento graduado da atividade da catalase nos estágios 40 a 46 e nos adultos, e diminuição da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) nos estágios 40 a 46 teve um aumento em adultos. Essas alterações sugerem que estas enzimas estejam envolvidas na proteção contra danos oxidativos produzidos pelo processo de metamorfose. Segundo Amicarelli et al. (2001) a atividade da enzima GST também pode ser alterada conforme os estágios de desenvolvimento da espécie *Bufo bufo*, sendo observada uma maior quantidade dessa enzima na fase adulta. Embora este processo de alteração na atividade das enzimas possam ter ocorrido naturalmente nos girinos no presente trabalho, observa-se de qualquer forma que a CAT aumenta sua atividade quando os animais são expostos ao minério de ferro e que a GST é ativada nos três tratamentos, na tentativa de desintoxicar o organismo.

#### **5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS**

Ao término dos experimentos foi contabilizada a mortalidade de apenas um indivíduo do tratamento T1. Os indivíduos de *Lithobates catesbeianus* expostos ao tratamento controle apresentaram desenvolvimento normal, com a maioria deles (77,8%) distribuída entre os estágios 42 e 47 do desenvolvimento (Tabela 3). Para os indivíduos que foram expostos ao tratamento T1, observa-se que cerca de 50% atingiram o estágio 47 (momento em ocorre o aparecimento por completo das pernas posteriores e a absorção total da cauda), e os demais se encontravam no intervalo de estágio entre 38 e 42. Nos tratamentos com ferro (T2) e manganês (T3), observou uma demora no seu desenvolvimento, comparados ao controle, visto que 50% dos indivíduos foram contabilizados entre os estágios 36 e 41 do desenvolvimento. Esses resultados indicam que o minério de ferro, o Fe-EDTA e o cloreto de manganês afetaram o desenvolvimento dos girinos dessa espécie, sendo que o minério de ferro afeta em uma proporção um pouco menor.

**Tabela 3.** Distribuição dos estágios de desenvolvimento em girinos de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle, ao fim de 30 dias.

ESTÁGIOS	TRATAMENTOS			
	Cont	T1	T2	T3
36	0	0	1	0
37	0	0	0	2
38	0	2	4	4
39	3	0	3	1
40	1	3	0	1
41	0	1	1	1
42	3	2	2	3
44	5	0	3	0
47	6	9	4	6
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>18</b>

Na análise morfológica, os indivíduos do controle após 30 dias de experimento, não apresentaram diferença significativa em relação aos demais tratamentos, para o comprimento total (Tabela 4). Para o comprimento do corpo o T3 foi diferente estatisticamente, e o comprimento da cauda o T1 foi diferente dos demais tratamentos. O peso dos indivíduos de *Lithobates catesbeianus* não teve diferença significativa entre os tratamentos, após a exposição de 30 dias. Essas poucas diferenças encontradas nos tratamentos em relação ao grupo controle refletem de certa forma os resultados obtidos com o estágio de desenvolvimento em que se encontravam os girinos deste estudo.

**Tabela 4.** Biometria de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; T3=Cloreto de manganês; Cont=Controle, ao fim de 30 dias. Os dados estão expressos em mediana. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

Tratamentos	Comprimento (mm)			Peso (g)
	Total	Corpo	Cauda	
Cont	85,3 <sup>a</sup>	37,4 <sup>a</sup>	53,5 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>
T1	91,7 <sup>a</sup>	37,7 <sup>a</sup>	73,3 <sup>b</sup>	6,5 <sup>a</sup>
T2	101,7 <sup>a</sup>	38,6 <sup>a</sup>	55,5 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>
T3	103,6 <sup>a</sup>	40,6 <sup>b</sup>	63,8 <sup>a</sup>	7,9 <sup>a</sup>

Veronez (2010) estudou o efeito do  $\text{CuSO}_4$  em girinos de *Rana catesbeiana* (corresponde a *Lithobates catesbeianus*), após 30 dias de exposição, observou que os animais do grupo controle avançaram nos estágios de desenvolvimento, apresentando desenvolvimento normal, conforme o esperado. Para os indivíduos que foram expostos ao tratamento de  $\text{CuSO}_4$ , obteve-se uma demora no seu desenvolvimento, ou seja, estes indivíduos quando comparados ao grupo controle estavam em estágios inferiores, demonstrando também que a presença do contaminante (sulfato de cobre -  $\text{CuSO}_4$ ) pode ter gerado algum efeito em seu metabolismo.

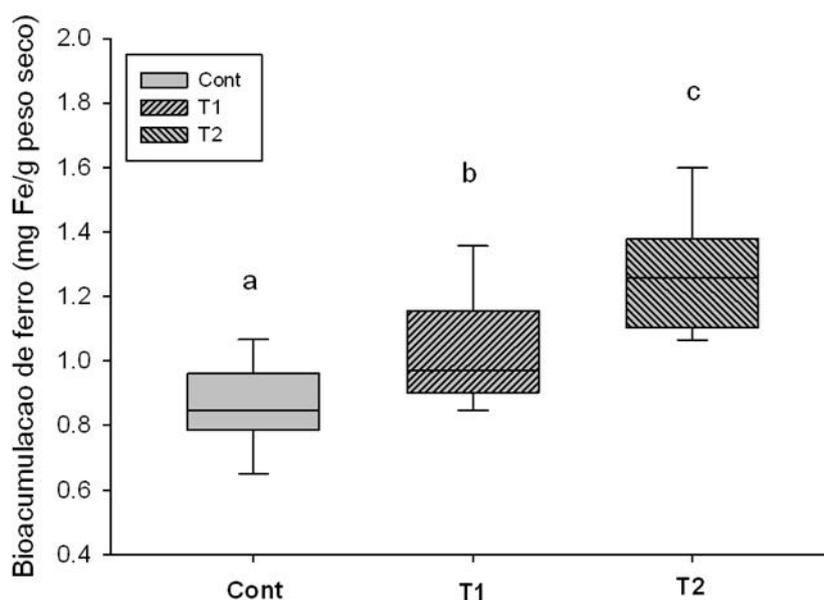
James e Littli (2003) fizeram exposição de girinos de *Bufo americanus* ao cádmio, iniciando logo após a eclosão e por toda a metamorfose, nas concentrações de 5 a 540  $\mu\text{g/L}$ . Os autores observaram que a concentração máxima do cádmio fez com que diminuísse o percentual na sobrevivência e na metamorfose, e as concentrações 5 e 54  $\mu\text{g/L}$  tiveram maior crescimento em relação aos controles. Segundo os autores, os anfíbios na fase de girinos quando expostos ao cádmio podem ser menos tolerantes aos estresses naturais no ambiente terrestre.

O efeito do cádmio sobre a sobrevivência e metamorfose de girinos de *Rana ridibunda* também foi observado por Loumbourdis et al. (1999) pelo período de 15 e 30 dias, os quais também observaram uma tendência no retardo do desses

animais expostos ao Cd. O atraso no crescimento pode ser um fator que contribui para o declínio das populações de anfíbios, uma vez que, devido ao seu tamanho menor, passam mais tempo em estágios mais vulneráveis, tornando-se assim mais suscetíveis a predadores. Os dados obtidos no presente estudo, mesmo apresentando poucas diferenças significativas na biometria dos animais quando associados à distribuição dos estágios de desenvolvimentos dos girinos sugerem que a exposição dos girinos de *L. catesbeianus* ao minério de ferro, ao ferro e ao manganês isolados compromete o processo de metamorfose desses animais, tornando-os mais vulneráveis.

### 5.5 BIOACUMULAÇÃO DE FERRO

A análise de bioacumulação de ferro corporal em girinos de *L. catesbeianus* mostra que houve um aumento na concentração desse metal no organismo dos animais expostos aos tratamentos T1 e T2 em relação ao controle (Figura 8), sendo que a quantidade de ferro bioacumulada nos animais expostos ao Fe-EDTA (T2) também foi maior que os animais expostos ao minério de ferro (T1).



**Figura 8.** Bioacumulação de ferro de *Lithobates catesbeianus*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=minério de ferro; T2=Fe-EDTA; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunnet's ( $p < 0,05$ ).

Metais como Fe, Cu, Al, Zn, Mn, também são encontrados em mineração de carvão, e estão propensos a acumularem-se em órgãos e tecidos de indivíduos que entram em contato com as cinzas. Testes feitos com indivíduos de *Hypsiboas faber*, que estão expostos à mineração de carvão foram observados o acúmulo principalmente de Fe, Cu e Al no fígado, rim e músculo (Zocche et al., 2013)

Complementando os dados de quantificação de metais na água e no sedimento da lagoa de Mãe-Bá, uma lagoa costeira do Espírito Santo, Pereira et al. (2008) analisaram a bioacumulação de metais em diferentes espécies de invertebrados coletados nesta lagoa. O resultado demonstrou que o gastrópode *Melanoides tuberculata* foi que concentrou mais Fe, Pb, Ni, Hg, e que a espécie *Pornacea haustum* concentrou mais Mn. Desta forma a mineração de minério de ferro e o seus processos contribuem como fonte de poluição para este ambiente e como fonte de metais para as lagoas tropicais (Ferreira et al., 2008).

Loumbourdis et al. (1999) avaliaram o efeito da bioacumulação de cádmio em *Rana ridibunda*, pelo período de 15 e 30 dias. Os autores encontraram que o acúmulo de cádmio nos girinos foi maior no período de 15 dias quando comparado com os girinos de 30 dias. A bioacumulação de ferro no presente trabalho foi realizada apenas ao final de 30 dias, mas foi possível observar que os girinos de *L. catesbeianus* expostos ao minério de ferro e ao Fe EDTA acumulam este metal em seu organismo. A biodisponibilidade e bioacumulação destes metais fazem com que estes indivíduos passem mais tempo em estágios mais vulneráveis, tornando mais suscetíveis aos predadores.

Em estudo realizado no pântano, localizado na Carolina do Sul (EUA), para investigar a bioacumulação de elementos traços em larvas rã-touro (*Rana catesbeiana*), e em relação três espécies de vertebrados e a quatro de invertebrados. O estudo revelou que as larvas de anfíbio podem acumular maiores concentrações de elementos traços, entre ele o Fe e o Mn, devido à sua ecologia alimentar. Segundo Unrine et al (2007) os anfíbios são propensos a acumular elementos traços e por conta disso é importante investigar a saúde de anfíbios em ambientes contaminados.

## 6 CONCLUSÃO

1. O minério de ferro, o Fe-EDTA e o cloreto de manganês causam danos genotóxicos nos girinos de *Lithobates catesbeianus* após exposição de 30 dias;

2. A exposição direta ao minério de ferro provoca acúmulo de ferritina plasmática nos girinos, como indicativo do aumento do estoque celular de ferro, na tentativa de impedir que o excesso de ferro no organismo se torne tóxico;

3. Ocorre uma ativação da enzima Glutathione S-Transferase, com o intuito de desintoxicar o organismo dos girinos expostos aos três contaminantes. O sistema de defesa dos girinos de *L. catesbeianus*, representado pela ação da enzima Catalase, foi ativado apenas nos animais expostos ao minério de ferro, outra rota de metabolização pode ter sido ativada durante a exposição ao Fe-EDTA e ao cloreto de manganês;

4. O processo de metamorfose é retardado nos animais expostos ao minério de ferro, ao Fe-EDTA e ao cloreto de manganês, embora esse efeito seja menor na exposição ao minério de ferro;

5. O ferro é bioacumulado nos girinos de *Lithobates catesbeianus* após 30 dias de exposição ao minério de ferro e ao Fe-EDTA;

6. Os efeitos tóxicos do ferro e do manganês não são potencializados quando associados ao minério de ferro.

## 7 REFERÊNCIA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126.
- Amicarelli, R.; Rangnalli, A. M.; Aimola, P.; Cattani, F.; Bonfigli, A.; Zarivi, O.; Miranda, M.; Ilio, C. D. 2001. Developmental expression and distribution of amphibian glutathione transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1526, p. 77-85.
- Amorim, L. C. A. 2003. Os biomarcadores e suas aplicações na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 6, n. 2.
- Apha, (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, New York. ed 18 , 1050.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. 2008. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed. 6, p. 919-921.
- Braga, L. G. T.; Lima, S. L. 2001. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 6, p. 1659-1663.
- Boock, M. V.; Machado Neto, J. G. 2005. Estudos sobre a toxicologia aguda do oxiclóreto de cobre para peixes *Poecilia reticulata*. Instituto de Pesca, São Paulo, v.31, n.1, p.29-35.
- Bucker, A.; Carvalho, W.; Alves-Gomes, J. A. 2006. Avaliação da mutanêse e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleotei: Gymmnofiformes) expostos ao bezeno. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 357-364.
- Bury, N. R.; Boyle, D.; Cooper, C. A. 2011. Iron. Homeostasis and toxicology of essential metals. *Fish physiology*, v. 31, part A, p. 201-251.

Buss, D. F.; Baptista, D. F.; Nessimian, J. L. 2003. Base conceitual para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19 (2):465-473.

Camargo, M. M. P.; Martinez, C. B. R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop. Ichth., v. 5, p. 327-336.

Cunha, E. R.; Delariva, R. L. 2009. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. Revista de Saúde e Biologia, v. 4, n. 2, p. 34-46.

Ezemonye, L.; Tongo, I. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibian (*Bufo regularis*). 2010. Chemosphere, v. 81, p. 214-217.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Biology and Toxicology, v. 25, n. 1, p. 5-32

Feng, S.; Kong, Z.; Wang, X.; Zhao, L.; Peng, P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. Chemosphere, v. 54, p. 457-463.

Ferraro, M. V. M. 2009. Avaliação de três espécies de peixes *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos. Tese doutorado, Curitiba.

Ferreira, C. M. 2001. Avaliação da toxicidade do cobre em girinos de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. Conferência Anfíbios: potencialidades, descobertas e perspectivas. Instituto de Pesca, SP.

Ferreira, C. M.; Pimenta, A. G. C.; Paiva Neto, S. 2002. Introdução à Ranicultura. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo, 33: 15.

Figueiredo, M. R. C.; Lima, S. L.; Agostinho, C. A.; Baêta, F. C.; Weigert, S. C. 2001. Estufas climatizadas para experimentos ambientais com rãs, em gaiolas. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 4, p. 1135-1142.

Gabriel, D.; Riffel, A. P. K.; Finamor, I. A.; Saccol, E. M. H.; Ourique, G. M.; Goulart, L. O.; Kochhann, D.; Cunha, M. A.; Garcia, L. O.; Pavanato, M. A.; Val, A. L.; Baldisserotto, B.; Llesuy, S. F. 2013. Effects of subchronic manganese chloride exposure on tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, p. 1-9. Article in Press.

Gaupale, T. C.; Londhe, J.; Ghaskadbi, S.; Subhedar, N. K.; Bhasgava, S. 2012. Immunohistochemical localization and biochemical changes in catalase and superoxide dismutase during metamorphosis the olfactory system of frog *Microhyla ornata*. Neuroscience Research, v. 72, p. 140-147.

Gosner, K.L. 1960. A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, v.16, p.183-190.

Grisolia, C. K.; Oliveira, A. B. B.; Bonfim, H.; Klautau-Guimarães, M. N. 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and molecular biology, v. 28, n. 2, p. 334-338.

Habig, W. H.; Jakoby W. B. 1981. Assays For Differentiation Of Glutathione S-transferases. Meth. Enzymol., v.77, p. 398-405.

Habig, W. H.; Pabst, W. B.; Jakoby W. B. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Biolog. Chemist., v. 249, p. 7130-7139.

Hansen, P. D. 2003. Biomarkers. Bioindicators and biomonitors. Chapter 6, p. 203-220.

James, S. M.; Little, E. E. The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles. 2003. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 22, ed. 2, p. 377-380.

Kardong, K. V. 2011. Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução. São Paulo: Roca, 5 ed.

Laks, D. 2010. Ferritina como marcados de resposta inflamatória em crianças criticamente doentes. Tese de Doutorado, Porto Alegre.

Lima, I. V.; Pedrozo, M. F. M. 2001. Ecotoxicologia do ferro e seus compostos. Salvador: CRA, v. 4.

Lisboa, E. B. F.; Moura, G. J. B.; Melo, I. V. C.; Andrade, E. V. E.; Figuerêdo Júnior, J. M. 2011. Ecologia de *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Anura, Hylidae) em remanescente de Mata Atlântica, Nordeste do Brasil. Revista Ibero-Americana de Ciência Ambientais, Aquidabã, v. 2, n. 1.

Loumbourdis N.S., P. Kyriakopoulou-Sklavounou, G. Zachariadis 1999. Effects of cadmium exposure on bioaccumulation and larval growth in the frog *Rana ridibunda*. Environmental Pollution, 104: 429-433.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological of chemical. 193, 265-275.

Luz, A. B.; Lins, F. A. F. 2004. Tratamento de Minérios: Introdução ao tratamento de minérios. Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia. Rio de Janeiro, 4 ed., cap. 1, p. 3-16.

Martins, M. L. N.; Sperling, E. V. 1997. Dinâmica do ferro e do manganês no hipolimnio do Reservatório Serra Azul em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, 1997, Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu, ABES. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes97/hipolimnio.pdf>. Acesso em: 04 mar 2013.

Martins V.; Manfredini V.; Benfato M. S. 2005. High Levels of Catalase In Sod Mutants Of *Saccharomyces cerevisiae* In High Aeration Conditions. *Braz. Jour. Microbiol.*, v.36, p. 347-351.

Miranda, G. S. 2009. Inquérito Civil nº 006/2009. Ministério Público do Estado do Espírito Santo, Curadoria do Meio Ambiente e do Urbanismo.

Moreira, T.; Nunes, E.; Leal, M.; Schulz, U.; Lemos, C. 2010. Influência dos Métodos de Captura de Peixes na Avaliação Genotóxica Utilizando Diferentes Tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 5(1): 1-7.

Mouchet, F.; Gauthier, L.; Mailhes, C.; Jourdain, M.J.; Ferrier, V.; Triffault, G.; Devaux, A. 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment*, v. 355, p. 232-246.

Orr, R. T. 1986. *Biologia dos vertebrados*. São Paulo: Roca, tradução da 5ª ed do original.

Osaki, S.; James, G. T.; Frieden, E. 1974. Iron metabolism of bullfrog tadpoles during metamorphosis. *Developmental Biology*, v. 39, p. 158-163.

Pan, Y. H.; Sader, K.; Powell, J. J.; Bleloch, A.; Gass, M.; Trinick, J.; Warley, A.; Li, A.; Brydson, R.; Brown, A. 2009. 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: New evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *Journal of Structural Biology*: v. 166, p. 22-31.

Pereira, A. A.; Hattum, B.; Brouwer, A.; Bodegom, M.; Rezende, C. E.; Salomans, W. 2008. Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in tropical coastal lagoon. *Journal Solis Sediments*: v. 8, p. 239-252.

Rada, M.; Rueda-Almonacid, J. V.; Velásquez-Álvarez, Á. A.; Sánchez-Pacheco, S. J. 2007. Descripción de las larvas de dos Centrolénidos (Anura:Centrolenidae) del noroccidente de la cordillera oriental, Comlomnia. *Papéis Avulsos de Zoologia*, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v.47, n.21, p. 259-272.

Ramos, A. D; Gasparini, J. L. 2004. Anfíbios do Goiapaba-Açu, Fundão, Estado do Espírito Santo. Ed. Vitória: Gráfica Santo Antônio.

Ramsdorf, W. 2007. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Canguuiri – UFPR). Dissertação de mestrado, Curitiba.

Rocha, C. A M.; Costa, A S.; Bandeira, A L. C.; Sagica-Junior; J. C.; Pinheiro, R. H. S.; Souza, Y. S. R. 2003. Estudo de micronúcleos e outras alterações nucleares em girinos de *Rana catesbeiana* expostos ao sulfato de cobre. *C. Ciências Biológicas, Genética*. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6209.htm>. Acessado em: 21 fev 2013.

Rocha, G. C. 2007. Avaliação da resposta fisiologia de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetida aos mecanismos estressores de captura, hipóxia e transporte. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesca, São Paulo.

Silva, J. Freitas, T. R. O.; Marinho, J. R.; Speit, G.; Erdtmann, B. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 241-245.

Simonato J.D, Guedes, CL.B., Martinez, CB.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 69, 112–120.

Takeda, A. 2003. Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, v. 41, p. 79-87.

Teixeira, P. C. 2007. Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Paulista, São Paulo.

Tice, R. R.; Arurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221.

Umbelino, D. C.; Rossi, E. A. 2006. Deficiência de ferro: consequências biológicas e propostas de prevenção. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.27, n.2, p.203-112.

Unrine, J. M.; Hopkins, W. A.; Romanek, C. S.; Jackson, B. P. 2007. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution*, v. 149, p. 182-192.

Veronez, A. C. S. 2010. Análise do impacto de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) na fase de girino da espécie de *Rana catesbeina* (rã-touro). Trabalho de conclusão de curso, Vila Velha.

Vieira, V. A. R. O. 2010. Regulação gênica dos receptores dos hormônios tireoidianos durante a metamorfose de anfíbios anuros. *Revista da Biologia-USP*, v.4. Vieira, M. C.; Torronteras, R.; Córdoba, F.; Canalejo, A. 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 78, p. 212-217.

Winter, M. J.; Ellis, L. C. J.; Hutchinson, T. H. 1994. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with YOSHIKAWA, H.; KAWAI, F.; KANAMORI, M. The relationship between the EEG and brain pH in carp, *Cyprinus carpio*, subjected to environmental hypercapnia at an anesthetic level. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 107, p. 307-312.

Zagatto, P. A. e Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p. 55-88.

Zhou, Q.; Zhang, J.; Fu, J.; Shi, J.; Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, v. 14, p. 135–150.

Zocche, J. J.; Damiani, A. P.; Hainzenreder, G.; Mendonça, R. A.; Peres, P. B.; Santos, C. E. I.; Debastiani, R.; Dias, J. F.; Andrade, V. M. 2013. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (Anuran Amphibian) in coal open-casting mine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.015>. Acesso em: 11 de mar de 2013.

## 8 ANEXO

## ANEXO 1 - tabela de composição do minério de ferro

CENTRO DE ANÁLISES		UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO																				
																						
		CAMPUS DR. LEONEL MIRANDA																				
		Rod. do Açúcar - km 5	Bairro: Penha																			
		Campos dos Goytacazes/RJ	CEP: 28020-560																			
		Tel.: (22) 2733 0505	Fax: 022 723 1324																			
RESULTADOS DE ANÁLISES QUÍMICAS DE SOLC			Data: 26/10/2010																			
Interessado: UUV / ALESSANDRO RAMOS COUTINHO			Solicitação: 1522010																			
Identificação	pH	P	K *	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MD	S.B.	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B	
Lab.	Int.	mg/dm <sup>3</sup>		cmol /dm <sup>3</sup>		%		g/dm <sup>3</sup>	cmol /dm <sup>3</sup>		%		mg/dm <sup>3</sup>									
1031	2	9,6	60	45	3,6	0,3	0,0	0,0	1,68	0,48	8,3	5,7	5,7	5,7	0	100	264,0	3,5	3,4	294,5	65,6	0,80
Página 1																						
1 - Lodo SAMARCO																						
2 - Minério de Ferro																						
3 - SAMARCO Ponto ETI																						
4 - SAMARCO PU																						
Obs:* O Laboratório só se responsabiliza pelos dados analíticos * Extrator Carolina do Norte																						
Local: Vila Velha/ES																						
Eng. Agr. Mauri dos Santos Manhães Responsável pelo Centro de Análises																						
B. = Soma de Base m = Saturação de Alumínio V = Saturação de Base T = CTC a pH 7,0 t = CTC Efetiva																						
CONVERSÕES: mg/dm <sup>3</sup> = ppm cmol e /dm <sup>3</sup> = meq/100 cm <sup>3</sup> g/dm <sup>3</sup> = % x 10																						