

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**PAULO CASTRO CARDOSO DA ROSA**

**RISCO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE  
COBRE E ESTUDO TOXICOLÓGICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Caçapava do Sul  
2018**

**PAULO CASTRO CARDOSO DA ROSA**

**RISCO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE COBRE E ESTUDO TOXICOLÓGICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Wagner

**Caçapava do Sul  
2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

R788r Rosa, Paulo Castro Cardoso da  
Risco de contaminação ambiental em área de mineração  
de cobre e estudo toxicológico em *Drosophila*  
*melanogaster* / Paulo Castro Cardoso da Rosa.  
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Pampa, ENGENHARIA AMBIENTAL E  
SANITÁRIA, 2018.

"Orientação: Caroline Wagner".

1. Toxicologia ambiental. 2. Contaminação por cobre.  
3. *Drosophila melanogaster*. I. Título.

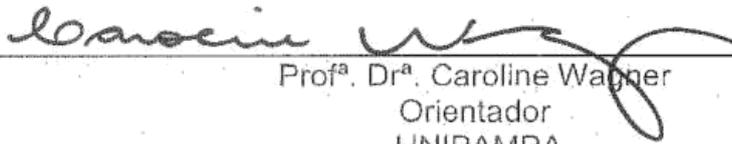
PAULO CASTRO CARDOSO DA ROSA

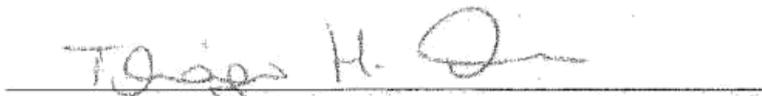
RISCO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE  
COBRE E ESTUDO TOXICOLÓGICO EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Ambiental e Sanitária da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial  
para obtenção do Título de Bacharel em  
Engenharia Ambiental e Sanitária.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 04 de julho de 2018.

Banca examinadora:

  
Prof.ª. Dr.ª. Caroline Wagner  
Orientador  
UNIPAMPA

  
Prof. Dr. Thiago Henrique Lugokenski  
UNIPAMPA

  
Prof. Dr. Júlio César Mendes Soares  
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Paulo e Eluza.

## AGRADECIMENTO

Agradeço imensamente a Deus, por ser a origem, o percurso, o sentido e o destino da minha vida.

A minha família, pai Paulo, mãe Eluza e irmãos Lucas e Maurício, por tudo, mas principalmente por todo amor que sempre demonstraram.

A minha orientadora professora Caroline, por toda sua sabedoria e grande capacidade de ensinar e orientar.

A Daniela por todo seu amor e companheirismo.

Aos meus amigos Victor, Karolina, Caiuan, Bruna e Mayara (coloquei vocês pela ordem que chegaram à minha vida, por favor, sem ciúmes) pela amizade, paciência e pela ajuda em diversas fases deste trabalho.

A todos os meus amigos da Igreja, que rezaram por mim.

A todos os meus colegas do curso pela parceria de sempre.

Aos meus queridos professores por todos os ensinamentos, mas principalmente aos professores Thiago, Júlio, Cristiane e Anelise, que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos técnicos da UNIPAMPA, mas em especial ao Guilherme e a Ângela que me ajudaram nas análises.

As muitas pessoas que passaram pela minha vida e me ensinaram a ser mais humano, a ter muita fé em Deus e a buscar sempre o conhecimento.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente desprovido de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão”.

São Francisco de Assis

## RESUMO

As atividades mineradoras são amplamente conhecidas por gerar impactos ambientais severos, sendo os metais pesados um dos principais e mais tóxicos resíduos deste tipo de atividade. O potencial tóxico dos metais pesados a fauna e a flora é diverso, podendo levar os organismos vivos a morte. As vias moleculares pelas quais os metais tóxicos causam seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidas. Dessa maneira, este trabalho avaliou as concentrações do metal Cobre (Cu) em uma área de rejeito ambiental de atividade de mineração e os seus efeitos em diversos parâmetros toxicológicos utilizando como modelo experimental a espécie de mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. Para tal, foram coletadas amostras de água de uma cava a céu aberto e quantificado o teor de cobre através de espectrometria de fluorescência de Raios-X (FR-X) e por análise colorimétrica através da técnica de complexação da cuprizona. Além disso, as moscas foram expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre: 0,5 mM, 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM e 100,0 mM, através do meio de cultivo. Foi determinada a mortalidade durante um período de sete dias. O efeito comportamental causado pela exposição a 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM de cobre foi avaliado através do teste de escalada. Além disso, essas mesmas concentrações foram usadas para avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e níveis de tióis (SH) livres segundo método de Ellman. Já a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) foi avaliada por espectrofluorimetria através do método de oxidação de diclorofluorceína diacetato. A quantificação do cobre no organismo das moscas foi determinada pelo método de FR-X. Como resultados, a média das concentrações de cobre na água é 0,51 mg/L. A mortalidade indicou que as concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM não apresentaram influência significativa sobre a análise de sobrevivência, já as concentrações 5,0 mM, 10,0 mM e 100,0 mM apresentaram um decréscimo estatisticamente significativo na sobrevivência dos indivíduos. Na análise comportamental observou-se uma diminuição da atividade locomotora, significativa apenas no grupo 5,0 mM. O cobre nas concentrações 0 mM e 1,0 mM não causou alteração na atividade da enzima AChE e nas concentrações 2,5 mM e 5,0 mM houve uma tendência na diminuição da atividade da enzima. O teste dos grupos SH livres demonstra uma diminuição nas concentrações de SH na concentração de 5,0 mM. Na análise das ERO's os resultados apresentaram uma tendência em diminuir a

fluorescência, porém os dados não foram estatisticamente significativos. Com a análise das moscas no FR-X, foi possível identificar que o cobre ficou bioacumulado no organismo dos indivíduos. Desse modo, conclui-se que o metal cobre nas concentrações testadas apresenta toxicidade significativa em *Drosophila melanogaster*, porém apenas em altas concentrações. Entretanto, em concentrações mais baixas como as encontradas na área de rejeito, o Cu não parece apresentar efeito tóxico neste modelo experimental. Além disso, as concentrações de cobre 0,51 mg/L encontradas na área de rejeito, extrapolam os limites para este metal na legislação vigente, indicando que esta é uma área de contaminação ambiental.

Palavras-Chave: Toxicologia ambiental. Contaminação por cobre. *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

Mining activities are widely known to generate severe environmental impacts, with heavy metals being one of the main and most toxic wastes of this type of activity. The toxic potential of heavy metals to animals and plants is diverse and can lead to dead bodies. The molecular pathways by which toxic metals cause their effects are still not fully understood. In this way, this work evaluated the concentrations of Copper (Cu) metal in an environmental reject area of mining activity and its effects in several toxicological parameters using as experimental model the species of fruit fly *Drosophila melanogaster*. For this, water samples were collected from an open pit and the copper content was quantified by X-ray fluorescence spectrometry (FR-X) and by colorimetric analysis using the cuprizone complexation technique. In addition, the flies were exposed to different concentrations of copper sulphate: 0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM and 10.0 mM and 100.0 mM, through the culture medium. Mortality was determined over a period of seven days. The behavioral effect caused by exposure to 1.0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM copper was assessed by the climbing test. In addition, these same concentrations were used to evaluate the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and levels of free thiols (SH) according to Ellman's method. Already the production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated by spectrofluorimetry using the oxidation method of dichlorofluorocine diacetate. The quantification of copper in the fly's organism was determined by the FR-X method. As a result, the average copper concentration in water is 0.51 mg / L. Mortality indicated that concentrations of 0.5 mM 1.0 mM and 2.5 mM had no significant influence on the survival analysis, whereas the concentrations of 5.0 mM, 10.0 mM and 100.0 mM showed a decrease statistically significant in the survival of individuals. The behavioral analysis showed a decrease in locomotor activity, significant only in the 5.0 mM group. Copper at concentrations of 0 mM and 1.0 mM did not cause alteration in AChE enzyme activity and at 2.5 mM and 5.0 mM concentrations there was a tendency for decreased enzyme activity. Testing the free SH groups demonstrates a decrease in SH concentrations at the concentration of 5.0 mM. In the analysis of ROS, the results showed a tendency to decrease fluorescence, but the data were not statistically significant. With the analysis of the flies in the FR-X, it was possible to identify that the copper was bioaccumulated in the body of the individuals. Thus, it is concluded that the copper metal at the

concentrations tested shows significant toxicity in *Drosophila melanogaster*, but only at high concentrations. However, at lower concentrations such as those found in the tailings area, Cu does not appear to have a toxic effect in this experimental model. In addition, the concentrations of copper 0.51 mg/L found in the tailings area exceed the limits for this metal in current legislation, indicating that this is an area of environmental contamination.

Keywords: Environmental toxicology. Copper Contamination. *Drosophila melanogaster*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Ciclo de Vida da <i>Drosophila melanogaster</i> .....   | 15 |
| Figura 2 – Cava a céu aberto onde foram realizadas as análises de campo .....  | 18 |
| Figura 3 – Curva padrão para determinação de cobre na água .....   | 23 |
| Figura 4 – Curva de sobrevivência de moscas expostas a diferentes concentrações de cobre no decorrer do tempo (sete dias)..... | 25 |
| Figura 5 – Comportamento de escalada das <i>D. melanogaster</i> tratadas com diferentes concentrações de cobre.....            | 27 |
| Figura 6 – Atividade da enzima AChE em <i>D. melanogaster</i> .....  | 28 |
| Figura 7 – Determinação dos tióis livres em <i>D. melanogaster</i> tratadas com $\text{CuSO}_4$ .....                          | 29 |
| Figura 8 – Produção de espécies reativas de oxigênio .....   | 31 |
| Figura 9 – Concentrações médias de cobre em <i>D. melanogaster</i> .....   | 32 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Formas de ocorrência de espécies de cobre.....   | 7  |
| Tabela 2 – Composição dos minérios de cobre .....   | 8  |
| Tabela 3 – Principais enzimas que possuem o cobre, com atividade oxidativa e redutora no ser humano ..... | 13 |
| Tabela 4 – Identificação de cobre na água da cava por FR-X.....   | 22 |
| Tabela 5 – Concentrações de cobre na água por espectrofotometria UV-Vis.....                              | 23 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

BCS – Dissulfonato de bathocuproína

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cu – Cobre

CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cobre

DCFH – Diclorofluoresceína

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

ERO'S – Espécies Reativas de Oxigênio

FR-X – Espectrometria de Fluorescência de Raios-X

mM – milimolar

Na<sup>+</sup> – Sódio

SH – Grupos tióis

μL – microlitro

μM – micromolar

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....                            | <b>3</b>  |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 3         |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                     | 3         |
| 2.3 Justificativa .....   | 3         |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                | <b>4</b>  |
| 3.1 Principais metais tóxicos .....                                 | 4         |
| 3.1.1 Mercúrio .....  | 5         |
| 3.1.2 Chumbo.....   | 5         |
| 3.1.3 Cromo.....  | 6         |
| 3.1.4 Zinco.....  | 6         |
| 3.2 Cobre.....  | 7         |
| 3.2.1 Características gerais.....                                   | 7         |
| 3.2.2 Ciclo e ocorrência na natureza .....                          | 7         |
| 3.2.3 Ocorrência em águas e sedimentos .....                        | 8         |
| 3.2.4 Ocorrência em solos.....                                      | 9         |
| 3.2.5 Bioacumulação .....   | 10        |
| 3.3 Toxicologia do cobre .....                                      | 10        |
| 3.3.1 Absorção .....  | 11        |
| 3.3.2 Distribuição.....   | 12        |
| 3.3.3 Papel do cobre no organismo.....                              | 12        |
| 3.3.4 Toxicodinâmica .....  | 13        |
| 3.4 Organismo-teste: <i>Drosophila melanogaster</i> .....           | 14        |
| 3.5 Toxicologia do cobre em <i>Drosophila melanogaster</i> .....    | 15        |
| 3.6 Risco de intoxicação animal por cobre .....                     | 17        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                  | <b>17</b> |
| 4.1 Estudo de campo .....   | 18        |
| 4.1.1 Área de estudo .....  | 18        |
| 4.1.2 Identificação da presença de cobre nas amostras de água ..... | 19        |
| 4.2 Estudo em <i>Drosophila melanogaster</i> .....                  | 19        |
| 4.2.1 Protocolo de exposição .....                                  | 19        |
| 4.2.2 Teste de sobrevivência.....                                   | 20        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.3 Avaliação da capacidade de escalada: teste comportamental .....                | 20        |
| 4.2.4 Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase .....                       | 20        |
| 4.2.5 Análise dos grupos tióis livres por espectrofotometria.....                    | 21        |
| 4.2.6 Análise das espécies reativas de oxigênio por espectrofluorimetria .....       | 21        |
| 4.2.7 Análise no espectrômetro de fluorescência de raios-x .....                     | 22        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>  | <b>22</b> |
| 5.1 Níveis de cobre na água da mina.....   | 22        |
| 5.2 Efeitos tóxicos do cobre em <i>D. melanogaster</i> .....                         | 24        |
| 5.2.1 Efeitos tóxicos do cobre em <i>D. melanogaster</i> sobre a sobrevivência ..... | 24        |
| 5.2.2 Efeitos tóxicos do cobre em <i>D. melanogaster</i> sobre o comportamento ..... | 26        |
| 5.3 Mecanismos de toxicidade do cobre .....  | 27        |
| 5.3.1 Atividade da enzima acetilcolinesterase.....                                   | 28        |
| 5.3.2 Determinação dos tióis livres.....   | 29        |
| 5.3.3 Produção de espécies reativas de oxigênio .....                                | 30        |
| 5.3.4 Determinação dos níveis de cobre em <i>D. melanogaster</i> por FR-X .....      | 31        |
| 5.4 Potencial risco toxicológico e ambiental.....                                    | 32        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>35</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As atividades mineradoras são de extrema importância para o desenvolvimento industrial e tecnológico da sociedade, entretanto segundo Silva (2007) essas atividades podem causar graves danos ao meio ambiente, podendo alterar fortemente a área minerada e as áreas próximas, onde são feitos os depósitos de estéril e de rejeito, aumentando consideravelmente a área passível de contaminação. Quando há substâncias químicas nocivas na fase de beneficiamento do minério pode acarretar na ampliação do potencial de contaminação ambiental.

A região do município de Caçapava do Sul, onde foi desenvolvida esta pesquisa, apresenta uma atividade mineradora bastante ativa que data do início do século XX (PESTANA et al., 2000; PESTANA; FORMOSO, 2003). Uma área de mineração de cobre tem chamado a atenção pelos seus altos níveis de contaminação deixados pelos rejeitos, na região de Minas do Camaquã, município de Caçapava do Sul, onde por mais de um século, houve a extração de minério de cobre, em vários ciclos intermitentes de exploração do minério cuprífero, e boa parte dos efluentes e rejeitos da atividade mineira foram lançados diretamente nos arroios da região. Estudos evidenciaram incrementos significativos, tanto das concentrações quanto dos fluxos totais da maior parte dos metais pesados, da área estudo para as demais partes da região, sob influência da mineração (LAYBAUER, 1995; 1998; BIDONE et al., 2001).

Os metais pesados são um dos principais e mais tóxicos resíduos de atividade mineradora (NRIAGU; PACYNA, 1988). A mineração de metais de interesse comercial tem contribuído com a liberação de rejeitos que compõem uma das principais formas de contaminação do solo e da água por metais pesados. Além disso, a poluição do solo e de sistemas aquáticos por metais pesados é um fator que afeta a qualidade do meio ambiente e constitui risco eminente de intoxicação ao homem (GUILHERME et al., 2005; MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Diversos metais, como o ferro, o zinco, o magnésio, o manganês e o selênio são considerados essenciais, pois são nutrientes requeridos por muitos organismos. Entretanto, sabe-se que estes metais essenciais, dependendo de suas concentrações, podem apresentar efeitos tóxicos em determinados organismos (KABATA-PENDIAS, 1993; 2004). Já outros metais, como mercúrio, alumínio, chumbo e cádmio, não são essenciais para os seres vivos, e podem causar efeitos

tóxicos nos organismos expostos a estes elementos (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

O potencial tóxico dos metais pesados ao organismo humano é diverso, podendo causar câncer, retardamento mental e de crescimento, disfunções renais e hepáticas, distúrbios na memória e aprendizado, podendo levar até a morte (GOYER; CLARKSON, 1996; JEFFERY, 2001). Os principais metais pesados presentes nos rejeitos de mineração são: o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cromo (Cr), manganês (Mg) e Cobre (Cu). Apesar do cobre, ser no organismo humano, um componente de várias metaloenzimas importantes no metabolismo das catecolaminas e do ferro, síntese da hemoglobina, colágeno e elastina e remoção de radicais livres, uma exposição excessiva pode levar a inibição da enzima acetilcolinesterase, além de apresenta efeito mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (RISSO-DE FAVERNEY et al., 2001).

A toxicidade decorrente da exposição a metais pesados pode ser devida ao deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação ou devida a interações químicas com biomoléculas endógenas, como os grupos tióis (SH). Os efeitos tóxicos geralmente resultam da alteração da estrutura de ácidos nucléicos e proteínas, interferência com o processo de fosforilação oxidativa e balanço osmótico, além de favorecerem o aparecimento do estresse oxidativo (HUGHES; POOLE, 1989; BRANDÃO et al., 2006).

A *Drosophila melanogaster*, é usada como modelo experimental alternativo ao uso de mamíferos, devido a questões éticas, de manutenção e possibilidade de ser utilizado em estruturas simples sem depender de maior aporte como criação de biotérios, serem de fácil manuseio e baixo custo (DAHMANN, 2008). A *Drosophila melanogaster* é um modelo que vem ganhando destaque e importância para o exame de problemas biológicos, especificamente genéticos, genômicos e evolutivos, bem como taxonômicos e neurobiológicos (RUBIN; LEWIS, 2000; TICKOO; RUSSELL, 2002; BIER, 2005).

Os mecanismos moleculares pelos quais os metais tóxicos causam seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, a concentração e forma de exposição podem alterar os mecanismos e potencial tóxico dos metais pesados.

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do metal cobre presente em rejeitos de uma área de mineração de cobre desativada em Caçapava do Sul - RS utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os níveis de cobre presente na água da mina de cobre a céu aberto, desativada, em Caçapava do Sul - RS;
- b) Estudar o efeito tóxico do cobre nos parâmetros de sobrevivência, longevidade, dano comportamental e atividade locomotora;
- c) Avaliar os mecanismos de toxicidade do cobre, através de parâmetros bioquímicos, como por exemplo, inibição enzimática e dano ao sistema nervoso.
- d) Relacionar os resultados encontrados para o modelo de *Drosophila melanogaster* com potencial risco de contaminação ambiental nas áreas analisadas.

### 2.3 Justificativa

O município de Caçapava do Sul, onde foi realizado este trabalho, é amplamente conhecida pela atividade mineradora de cobre datada desde o início do século XX. Esta atividade foi encerrada no final do século passado e possivelmente deixou uma contaminação ambiental, a qual pode gerar danos à saúde das pessoas que habitam a região próxima à mina desativada.

O encerramento das atividades de extração mineral de cobre deixou para a região vários quilômetros de minas subterrâneas desativadas e também uma cava a céu aberto, além de um pequeno povoado chamado Minas do Camaquã, no terceiro distrito do município de Caçapava do Sul. Deste modo, onde localiza-se a cava a céu aberto formou-se uma grande lagoa, a qual atualmente é um ponto de ecoturismo, no qual pode-se praticar mergulho e canoagem, sendo assim, é de

extrema importância avaliar se é possível haver algum dano a saúde dos indivíduos expostos a contaminação por meio destas atividades recreativas.

Além do mais, nas proximidades da referida lagoa formou-se uma cidadela na qual habitam moradores locais e ex-funcionários das minas, estas pessoas podem estar expostas a contaminação, no caso de a água da mina desativada possuir a presença de cobre e entrar em contato com as águas naturais daquela região.

Conforme a realidade descrita anteriormente, este trabalho justifica-se pelo fato de avaliar se ocorre a contaminação pelo cobre nas águas que inundam a cava a céu aberto e se a predita contaminação pode causar risco à saúde dos indivíduos envolvidos, além de ser uma questão de saúde pública e de toxicologia ambiental.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Principais metais tóxicos**

Metal pesado é um tipo de elemento químico que possui elevada massa atômica, bem como alta densidade, dos quais muitos apresentam toxicidade para os seres vivos, uso intensivo e ampla distribuição. Estes fatores podem aumentar o risco toxicológico que os seres vivos e o meio ambiente estão expostos. Além disso, estes elementos não podem ser totalmente degradáveis em formas que não apresentam toxicidade, entretanto eles podem ser transformados em formas insolúveis, ou seja, indisponíveis para o meio biológico. Os metais pesados têm como destino último, geralmente, os solos ou sedimentos (BAIRD; CANN, 2011).

Os metais pesados podem ser poluentes das águas, solos e da atmosfera, além de apresentarem diferentes formas de especiação e toxicidade. O principal mecanismo de ação tóxica destes metais está relacionado à grande afinidade dos cátions com o enxofre, desse modo, os cátions de metais pesados consumidos ou as moléculas que os contém acabam se ligando aos grupos Tióis – SH presentes nas enzimas. Com isto, a enzima torna-se inativa, causando transtornos no organismo dos seres vivos, podendo levar até mesmo a morte (BAIRD; CANN, 2011).

### 3.1.1 Mercúrio

O mercúrio é um metal que na forma elementar pode ser empregado em múltiplas aplicações, por possuir muitas características, como por exemplo, ser um líquido condutivo. Desse modo, a ampla utilização do mercúrio facilita a sua liberação para o ambiente (BAIRD; CANN, 2011).

Além de possuir uma alta densidade, o mercúrio também possui extrema volatilidade e seu vapor é altamente tóxico, no caso de os átomos serem inalados eles se difundem dos alvéolos pulmonares para o sangue. Na forma eletricamente neutra, o mercúrio atravessa a barreira cérebro-sangue, atingindo o cérebro, causando graves danos ao sistema nervoso central (BAIRD; CANN, 2011). A maior parte do mercúrio no meio ambiente é inorgânico, na forma do íon  $2+$  ou mercúrio (II). Em menor extensão, que o vapor, os íons de mercúrio atingem o sistema nervoso central, entretanto os principais órgãos que são alvo do  $Hg^{2+}$  são o fígado e o rim (BAIRD; CANN, 2011).

O íon  $Hg^{2+}$  pode se complexar com o ânion metil,  $CH_3^-$  e, com isso, formar o volátil molecular dimetilmercúrio,  $Hg(CH_3)_2$ , este processo ocorre nos sedimentos de rios e lagos, em condições anaeróbias. Os compostos de metilmercúrio são mais facilmente encontrados na superfície de sedimentos em águas anaeróbias. Sedimentos com grande composição de matéria orgânica em lagos rasos, de fácil aquecimento, e pântanos são locais excelentes para a formação de metilmercúrio (BAIRD; CANN, 2011).

O metilmercúrio é solúvel em tecidos gordurosos, e capaz de bioacumular e biomagnificar, além de apresentar significativa mobilidade. É a forma mais tóxica do mercúrio, sendo seu principal mecanismo de toxicidade o dano no sistema nervoso. No cérebro, ele é convertido para  $Hg^{2+}$ , que pode se ligar a proteínas e enzimas, causando a geração de espécies reativas de oxigênio, além de interferir no transporte de cálcio mitocondrial (BAIRD; CANN, 2011; WAGNER et al., 2010).

### 3.1.2 Chumbo

A manipulação do chumbo pelo ser humano já ocorre a milhares de anos. Ele foi largamente utilizado como munição, aditivo para coloração em tintas e na fabricação de utensílios domésticos. A concentração do chumbo no meio ambiente

ainda apresenta aumento, apesar de haver uma política de redução da sua emissão em países desenvolvidos (BAIRD; CANN, 2011). Por muitos anos, ele foi utilizado como agente antidetonante na gasolina, principalmente na forma de tetra aquilas de chumbo, o que contribuiu muito para elevar seus níveis na atmosfera.

O chumbo quando consumido é transportado pelo sangue até os órgãos, podendo se depositar no cérebro e ocasionalmente, nos ossos. Com o passar da idade, o chumbo acumulado nos ossos pode ser liberado para a corrente sanguínea, por meio do desgaste ósseo, voltando a exercer sua toxicidade em diferentes órgãos (BAIRD; CANN, 2011).

### **3.1.3 Cromo**

O cromo é encontrado, principalmente, na forma de íons inorgânicos, seus principais estados de oxidação são  $\text{Cr}^{3+}$  ou Cr(III) e  $\text{Cr}^{6+}$  ou Cr(VI), também podem ser chamados de cromo trivalente e cromo hexavalente (BAIRD; CANN, 2011).

A ocorrência do cromo como íon dissolvido na água ou precipitado depende se o ambiente onde ele se encontra é anaeróbico ou aeróbico, a grande diferença entre os dois é que o Cr (VI) é tóxico e possivelmente carcinogênico, já o Cr (III) pouco biodisponível. Devido ao fato de o cromo hexavalente apresentar alta toxicidade, solubilidade e mobilidade é considerado de alto risco toxicológico, além disso, o íon cromato apresenta genotoxicidade (BAIRD; CANN, 2011).

### **3.1.4 Zinco**

Os danos causados pela deficiência de zinco no organismo foram estudados por anos, entretanto recentemente as pesquisas foram direcionadas para as consequências do consumo excessivo de zinco. Diferentes concentrações de zinco consumidas apresentam diferentes manifestações de distúrbios. Este metal apresenta baixa toxicidade, principalmente quando consumido de forma oral. No entanto, o aparecimento de sintomas de toxicidade, tais como, náuseas, vômitos, dor epigástrica, letargia e fadiga ocorrerem com ingestão de zinco extremamente alta. Quando os indivíduos são contaminados com baixas concentrações de zinco, mas relativamente altas se comparadas com as normalmente consumidas na dieta cotidiana, o organismo apresenta deficiência de cobre, anemia, danos no sistema



O cobre é um componente natural do solo que alcança as margens dos rios e lagos por ação das chuvas ou movimentação do solo. A grande maioria do cobre solto para os recursos hídricos apresenta-se como material particulado (PEDROZO, LIMA, 2001).

Tabela 2 – Composição dos minérios de cobre.

| Óxidos     |   | Sulfetos    |  |
|------------|---|-------------|--|
| Malaquita  | $\text{Cu}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ | Calcocita   | $\text{Cu}_2\text{S}$                                    |
| Azurita    | $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$         | Calcopirita | $\text{CuFeS}_2$   |
| Cuprita    | $\text{Cu}_2\text{O}$                                 | Covalita    | $\text{CuS}$   |
| Atacamita  | $\text{CuCl}_2$                                       | Bornita     | $\text{FeS} \cdot 2\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{CuS}$ |
| Brocantita | $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$         |             |  |

Fonte: Pedrozo e Lima, 2001.

O cobre possui várias origens para se apresentar em um sistema ambiental, que pode ser local ou até mesmo global, estas fontes podem ser de origem natural ou por ação do homem. As fontes naturais de exposição ao cobre incluem poeira, vulcões, vegetação em decomposição, incêndios florestais e pulverização marinha. As emissões antropogênicas incluem fundições, fundições de estações e fontes de combustão, tais como incineradores municipais. A maior liberação de cobre para a terra é de rejeitos de minas de cobre e lodo de esgoto (WHO, 1998).

Da mesma forma que outros metais, o cobre é disperso por meio do ciclo hidrológico que desloca as partículas. Dependendo do escoamento das águas, as partículas se decantam gerando os sedimentos. Além disso, uma origem considerável de cobre nos sedimentos dos mares são os organismos mortos (WHO, 1998).

### 3.2.3 Ocorrência em águas e sedimentos

Muitos processos atuam sobre a disponibilidade do cobre no sistema aquático, tais como, complexação a materiais orgânicos ou inorgânicos, ligação a

óxidos metálicos, argilas ou partículas em suspensão, bem como bioacumulação (PEDROZO E LIMA, 2001).

Há diversas formas de ocorrência de um determinado metal no meio ambiente, isto também é válido para o cobre, pode se apresentar em diversas espécies, algumas mais significativas quantitativamente e outras menos. Desse modo, as formas mais significativas solúveis em águas doce e salgada são  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}(\text{HCO}_3)$  e  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (PEDROZO E LIMA, 2001).

A forma na qual o cobre é encontrado nas águas depende significativamente do pH das mesmas, sendo que, normalmente, nos valores de pH característicos de águas naturais, grande parcela do  $\text{Cu}^{2+}$  que está dissolvido é encontrado na forma de complexos (PEDROZO E LIMA, 2001).

O cobre se liga preferencialmente à matéria orgânica e aos óxidos de ferro (PEDROZO E LIMA, 2001). Desse modo, quando encontra-se relacionado aos meios hídricos, pode estar em diferentes formas e também interagindo com diversas substâncias, como por exemplo, dissolvido, formando hidróxidos, complexado a aminoácidos, precipitado, ligado a argilas, complexado a material orgânico. Além disso, as águas naturais apresentam diversas espécies orgânicas e isto influencia a capacidade de complexação e os complexos que poderão ser formados (PEDROZO E LIMA, 2001).

Ocorre uma inter-relação entre a disponibilidade de cobre em sedimentos e a presença de sulfetos ácidos voláteis (SAV) nas águas. Além disso, estes sulfetos podem neutralizar a toxicidade do cobre, dependendo de sua concentração, por exemplo, quando a concentração dos SAV é superior a soma da concentração molar dos metais que estão presentes nesse meio (PEDROZO E LIMA, 2001).

#### **3.2.4 Ocorrência em solos**

A presença natural de cobre em solos depende das concentrações desse metal nas rochas que deram origem ao respectivo solo e o seu grau de degradação. O cobre pode apresentar-se de diferentes formas, tais como, solúvel, fixada pelos minerais do solo, precipitada com outros componentes, na biomassa e complexada com matéria orgânica (BETTIOL; CAMARGO, 2000).

### 3.2.5 Bioacumulação

O cobre é um elemento primordial à vida em geral, participando no caso do organismo humano no procedimento de fixação do ferro na hemoglobina do sangue. Foi distinguido em plantas e animais no século XIX e declarado como catalisador biológico no século XX. No cérebro e fígado são encontradas elevadas concentrações de cobre (WHO, 1998)

A bioacumulação é dita como um sistema de absorção do cobre pelos seres vivos por meio dos fatores que se encontram ao seu redor, que podem ser água, sedimento, solo e alimentos (PEDROZO; LIMA, 2001). Quando há uma grande disponibilidade de cobre, maior será o seu potencial tóxico ou de bioacumulação (WHO, 1998).

### 3.3 Toxicologia do cobre

O cobre é conhecido por ser um metal traço, ou seja, está presente no organismo dos seres vivos, desta forma colabora para a ocorrência de diversas reações bioquímicas que compõem o metabolismo dos indivíduos, podendo atuar como cofator de várias enzimas, tais com, catalase, citocromoxidase, dopamina- $\beta$ -hidroxilase e peroxidases (PEDROZO; LIMA, 2001).

Os sintomas apresentados a partir da deficiência do cobre são problemas cardíacos, disfunção nas concentrações de colesterol LDL e HDL, diminuição de algumas enzimas, como por exemplo, metionina e encefalinas leucínicas e cobre-zinco superóxido dismutase eritrocitária, pode ocorrer ainda diminuição da depuração da glicose no organismo (PEDROZO; LIMA, 2001).

Difícilmente ocorrerá toxicidade aguda em humanos pelo consumo do cobre, entretanto quando acontece, a ingestão é de forma acidental devido ao consumo de água contaminada (WHO, 1998). Foram observados efeitos gastrointestinais a partir da ingestão única e repetida de água potável contendo altas concentrações de cobre, bem como insuficiência hepática posterior a ingestão crônica de cobre (WHO,1998).

Mesmo o cobre sendo um componente essencial a vida, podem ocorrer muitas alterações na estabilidade deste metal no organismo resultando na sua falta ou excesso. Um exemplo dessas alterações é uma patologia genética, a Síndrome

de Wilson, que pode ser definida como uma doença metabólica, recessiva, autossômica, hereditária, na qual ocorre uma alteração no gene chamado ATP7B presente no cromossomo 13. Esta patologia ocasiona uma disfunção no transporte do cobre o que leva a uma toxicidade crônica. Mesmo em baixas concentrações, a celuroplasma facilita o acúmulo de altas concentrações de cobre, primeiramente no fígado e posteriormente no cérebro e outros órgãos, com isso, o metal acaba não sendo excretado via bile (PEDROZO; LIMA, 2001).

A doença de Menkes é um distúrbio raro recessivo ligado ao cromossomo X, devido a mutações no gene *atp7a*, prejudicando a absorção e o metabolismo celular de cobre (MANARA et al., 2017). Alguns dos sintomas desta doença são semelhantes aos de deficiência de cobre, bem como anomalias ósseas, retardamento mental grave, neurodegeneração e em casos mais sérios, óbito infantil (WHO, 1998).

### **3.3.1 Absorção**

O cobre é consumido principalmente por estar presente nos alimentos, sendo as suas concentrações variadas, dependendo do tipo de alimento. De forma geral, este metal não está presente em concentrações significativas na água disposta para consumo humano (WHO, 1998).

A principal via de absorção do cobre é o sistema gastrointestinal, entretanto baixas concentrações podem ser absorvidas pela pele. A absorção intestinal é um processo influenciado por diversos fatores fisiológicos e referentes a dieta alimentar (WHO, 1998).

Segundo o que foi revisado por WHO (1998) experimentos com radioisótopos em animais demonstram que o cobre é absorvido do estômago até certo ponto, porém o principal local de absorção é o duodeno. O pH do estômago é capaz de dissociar muitos complexos de cobre que possuem uma estrutura mais fracas, além de ocorrer degradação enzimática de proteínas e fibras consumidas através dos alimentos, estes fatos tornam o cobre disponível para ser consumido pelo organismo (WHO, 1998).

### 3.3.2 Distribuição

Após absorção pela mucosa intestinal o cobre é transportado para o fígado, tendo como principal ligação à albumina. Estudos feitos em ratos com o Cobre 64 demonstram que este aparece primeiramente no sangue complexado com albumina (NEUMANN; SASS-KORTSAK, 1967). A ceruloplasmina não tem um papel no transporte de cobre do intestino para o fígado, que é realizado principalmente por albumina e complexos de aminoácidos, ou seja, a circulação do cobre no sangue está ligada a albumina (BLIGH et al., 1992).

A metalotioneína é a principal proteína de ligação do cobre no fígado. Existe uma evidência crescente que esta proteína desempenha um papel importante na desintoxicação celular do cobre, entretanto também foi proposto que há, por parte dela, um envolvimento na captação, armazenamento e transferência de cobre (BREMNER, 1987). Além disso, a proteína l-histidina aumenta a captação celular de cobre, bem como, a troca de cobre entre a l-histidina e a albumina articula a disponibilidade de cobre para a célula (DESCHAMPS et al., 2005).

A partir do total de cobre absorvido, aproximadamente 20% localiza-se no fígado, que é um órgão de armazenamento, do qual o metal será retirado em casos de necessidade, além disso, quase 40% localizam-se nos músculos e cerca de 20% no cérebro. Os tecidos conectivos, sangue e rins possuem cada um deles, cerca de 8% (WHO, 1998; PEDROZO E LIMA, 2001).

### 3.3.3 Papel do cobre no organismo

A grande importância do cobre para os seres vivos está no fato deste metal ser um dos componentes de várias enzimas e proteínas estruturais, conforme apresentado na Tabela 3. O Cobre exerce inúmeras funções no organismo devido a sua atuação nas atividades enzimáticas de oxidação e redução, isso se deve ao fato dele atuar como um elétron intermediário transferência. Além disso, atua como co-fator e componente alostérico. O cobre é o principal componente do centro catalítico de várias enzimas que atuam nos processos de redução, também é um metal essencial em muitos processos fisiológicos, tais como, respiração celular, síntese de melanina, biossíntese de tecido conectivo, defesa contra radicais livres e metabolismo de ferro intracelular (PEDROZO; LIMA, 2001).

Desse modo, é perceptível a importância do cobre enquanto atua nos organismos vivos como metal traço, sendo um nutriente essencial para o bem andamento da vida.

Tabela 3 – Principais enzimas que possuem o cobre, com atividade oxidativa e redutora no ser humano.

| <b>Enzima</b>                  | <b>Função</b>   |
|--------------------------------|---|
| Citocromo-c oxidase            | Transporte de elétron, oxidase terminal                           |
| Superóxido dismutase           | Destruição do radical superóxido, dismutação                      |
| Catecol oxidase                | Síntese de melanina   |
| Lisil oxidase                  | Colágeno, elastina <i>cross-linking</i>                           |
| Ceruloplasmaina                | Transporte de cobre, oxidação (ferroxidase)                       |
| Aminoxidases                   | Desaminação de aminas primárias                                   |
| Dopamina- $\beta$ -monoxígenas | Síntese de norepinefrina (conversão de dopamina em norepinefrina) |
| Peptidilglicina monoxigenase   | $\alpha$ -amidação de neuropeptídeos                              |

Fonte: Pedrozo e Lima, 2001.

O cobre é um grande colaborador para a regulação da expressão gênica, ele exerce esta função por meio da sua ligação com a metalotioneína. (BLALOCK; DUNN; COUSINS, 1988.).

### 3.3.4 Toxicodinâmica

A toxicidade por parte do cobre ocorrerá somente quando os mecanismos de controle homeostático estão sobrecarregados e também quando os mecanismos celulares básicos de defesa ou reparação são prejudicados (WHO, 1998).

A ocorrência de toxicidade por parte do cobre em um sistema biológico depende da configuração específica de seus elétrons, por exemplo, o  $\text{Cu}^+$  é altamente polarizável e se liga preferencialmente ao nitrogênio ou a estruturas que contenham o enxofre, por meio do compartilhamento de seus orbitais. Já o  $\text{Cu}^{2+}$  é capaz de formar complexos com estruturas que contenham oxigênio e até mesmo ligações parcialmente covalentes com estruturas que contenham nitrogênio e enxofre. Desse modo, pode-se dizer que o cobre é bastante reativo e possui a capacidade de se ligar fortemente a estruturas ricas em elétrons (WHO, 1998).

O excesso de cobre provoca as seguintes reações no organismo: saída do metal de seus sítios ativos causando modificações nas membranas celulares, como despolarização e dano dos receptores ou moléculas transportadoras; ligação do cobre a macromoléculas, como DNA ou enzimas contendo grupos tióis ou carboxilas, causando a inativação destas enzimas e genotoxicidade; e dano celular devido a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) pela reação de Fenton (GOLDSTEIN; CZAPSKI, 1986; WHO, 1998):



A geração demasiada desses radicais pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que ocasiona o stress oxidativo no organismo, que por sua vez pode levar a oxidação dos grupos tióis, peroxidação lipídica, dano no DNA, dano em organelas como o lisossomo e a mitocôndria, o que diminui a produção de ATP (WHO, 1998).

### **3.4 Organismo-teste: *Drosophila melanogaster***

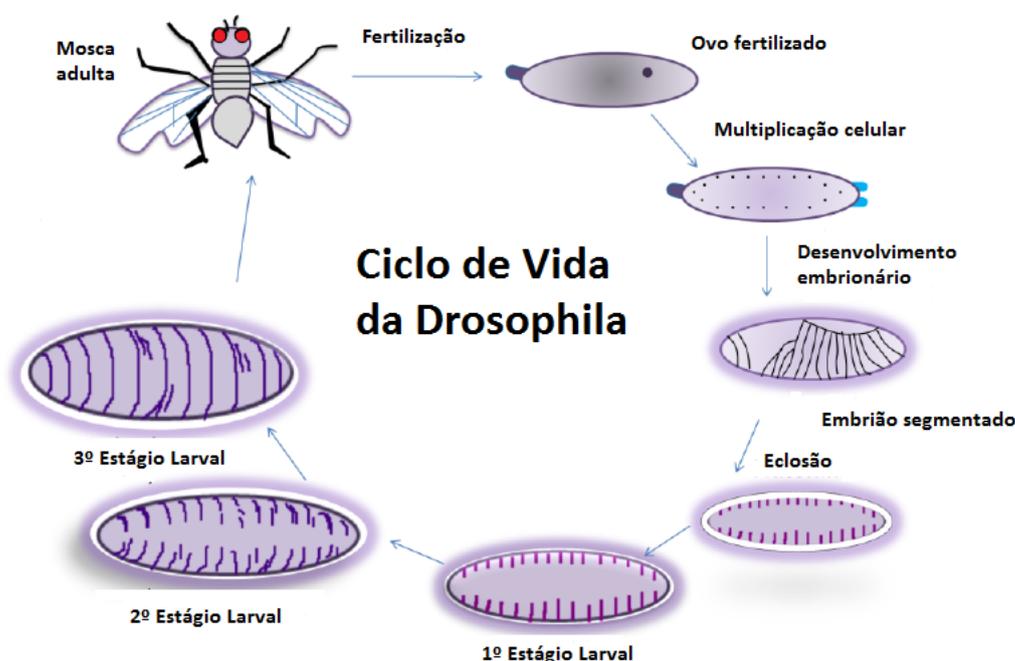
A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como a mosca da fruta é um organismo modelo experimental que tem sido usado no estudo de problemas biológicos, principalmente na área da genética. Muitos cientistas concentraram sua atenção no uso da *Drosophila* como modelo experimental para a compreensão de doenças neurodegenerativas (CELOTTO; PALLADINO, 2005).

A *Drosophila* torna-se um excelente modelo de pesquisa devido a vários fatores, tais como, possui um rápido ciclo de vida, o que facilita o estudo toxicológico em várias etapas da vida dos indivíduos, além disso, as moscas são de fácil manuseio e não necessitam de instalações complexas, como biotérios. Pode ser destacado também que as moscas podem substituir os mamíferos em pesquisas experimentais e possuem as vantagens anteriormente citadas, em relação aos mamíferos (DAHMAN, 2008).

A larva de *Drosophila melanogaster* demora 24 horas após a fertilização para eclodir, mas as diferentes regiões de larvas se definem várias horas antes da eclosão. As larvas de primeiro estágio alimentam-se do meio de cultura e após cerca de 25 horas formam um verme maior, sendo este o segundo estágio. As larvas de

segundo estágio levam aproximadamente 24 horas para alcançarem o terceiro estágio. As larvas de terceiro estágio alimentam-se do meio de cultura e rastejam sobre ele, após 30 horas tornam-se pupas. A pupa é branca amarelada, mas a medida que vai se desenvolvendo adquire coloração mais escura de forma progressiva, durante este estágio ocorre a metamorfose da larva em mosca adulta, depois que a mosca adulta fêmea emerge demora de 4 a 12 horas para adquirir as suas características sexuais, podemos observar este ciclo na figura 1. (VIJAYALAKSHMI, 2013).

Figura 1 – Ciclo de Vida da *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Adaptado de Vijayalakshmi, 2013.

### 3.5 Toxicologia do cobre em *Drosophila melanogaster*

Conforme alguns estudos a contaminação do meio de cultivo com baixas concentrações de cobre (micro-molar) diminui o tempo de vida e a atividade locomotora de moscas machos, entretanto não afeta as fêmeas. Além disso, essas baixas concentrações também diminuem a sobrevivência e causam distúrbios neurológicos em *Drosophilas* (ARCAYA et al., 2013; 2014).

O efeito negativo do cobre sobre as moscas contaminadas depende da sua genética e de seu gênero, já que ambos os fatores podem afetar a regulação da

metaloioneína, das proteínas e também a homeostase de metais biologicamente necessários (BALINSKI; WOODRUFF, 2017).

A Glutathione (GSH) exerce um importante papel na regulação de níveis de cobre no cérebro, com isso a redução da biossíntese de glutathione leva a deficiência funcional de cobre nos neurônios, causando defeitos neurológicos em *Drosophila melanogaster* (MERCER et al., 2016).

Tanto a deficiência, causada pela adição de 300  $\mu$ M de dissulfonato de bathocuproína (BCS) que produz alimentos com deficiência de cobre, quanto o excesso de cobre, causado pela adição de 1.0 mM e 1.5 mM deste metal, apresentam efeitos prejudiciais sobre o funcionamento do sistema nervoso central da *Drosophila*, impedindo a sua sobrevivência. Além disso, causam impacto sobre uma via neuropeptídica específica (HWANG et al., 2014).

Os mecanismos de absorção, sequestro, distribuição e fluxo do cobre em *D. melanogaster* são altamente semelhantes aos dos mamíferos. Em questão organizacional, o transporte do cobre dentro do intestino médio da *Drosophila* é parecido ao dos enterócitos de mamíferos, enquanto os sistemas renais e hepáticos de mamíferos são mais bem conservados do que os das *D. melanogaster* e elas não possuem um sistema de excreção biliar como nos mamíferos. O cobre que se encontra na hemolinfa é possivelmente ligado à proteína (SOUTHON; BURKE; CAMAKARIS, 2013).

Em *D. melanogaster* a regulação da homeostase de cobre está ligada a de outros metais como zinco e ferro, o que talvez seja mais bem demonstrado pela atividade de ferroxidase da cupro-proteína ceruloplasmina, bem como do antioxidante SOD1, que requer cobre e zinco. Além disso, o transportador de ferro DMT1 pode transportar zinco, cobre e outros cátions divalentes. Destaca-se ainda que o transportador de zinco Zip4 pode ter atividade de transporte de cobre (SOUTHON; BURKE; CAMAKARIS, 2013).

Segundo um estudo (BONILLA-RAMIREZ; JIMENEZ-DEL-RIO; VELEZ-PARDO, 2011) o cobre apresenta toxicidade aguda, na concentração 15 mM por até 5 dias e crônica, na concentração 0,5 mM por até 15 dias, além disso a exposição a este metal reduz significativamente vida útil e atividade locomotora, ou seja, capacidades de escalada em *Drosophila melanogaster*. O cobre acumula-se dramaticamente no cérebro das moscas, que são alimentadas cronicamente ou agudamente com este metal, desse modo, demonstra-se que a acumulação do

cobre na cabeça das moscas está associada a neurodegeneração causada por várias doenças dopaminérgicas. Ademais, o cobre pode causar dano a um grupo de genes neurais, portanto este metal é capaz de destruir os neurônios, bem como o cérebro da mosca, prejudicando assim seu movimento e capacidade de escalada. Além disso, o cobre induz sintomas de Parkinson em *D. melanogaster* (BONILLA-RAMIREZ; JIMENEZ-DEL-RIO; VELEZ-PARDO, 2011).

### **3.6 Risco de intoxicação animal por cobre**

A espécie mais susceptível a intoxicação por cobre é a ovina, ocorrendo inclusive em pastejo com altas concentrações de cobre e baixas de molibdênio no solo. O consumo excessivo de cobre leva a acúmulo nos tecidos, principalmente no fígado, sem que sejam observados sinais clínicos. Em situações de stress e quando o fígado esgota sua capacidade de armazenamento o cobre é liberado rapidamente para o sangue, causando uma crise hemolítica, caracterizada hemoglobinúria, icterícia e hemorragias generalizadas. A necropsia revela sempre severa necrose hepática. Outros sintomas são observados na intoxicação por cobre são gastroenterite severa com dor e diarreia devido a irritação das mucosas, queda da temperatura corporal, aumento da frequência cardíaca, colapso e morte em 24 horas. O molibdênio pode ajudar nos casos de intoxicação por cobre, ajudando a diminuir a sua absorção. (DIAZ GONZALEZ, 2000). A criação de ovelhas também pode ser observada na região próxima a área de estudos, estando estes animais expostos ao risco de contaminação por cobre.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para realização desta pesquisa, as análises foram divididas em duas etapas: a primeira fase da pesquisa denominada estudo de campo, na qual foram realizados estudos na área onde é localizada a cava a céu aberto de cobre, que se encontra desativada, nas Minas do Camaquã, zona rural de Caçapava do Sul. A segunda fase da pesquisa consistiu nas análises utilizando a espécie *Drosophila melanogaster* como modelo experimental, com a finalidade de identificar o potencial tóxico do cobre em organismos vivos.

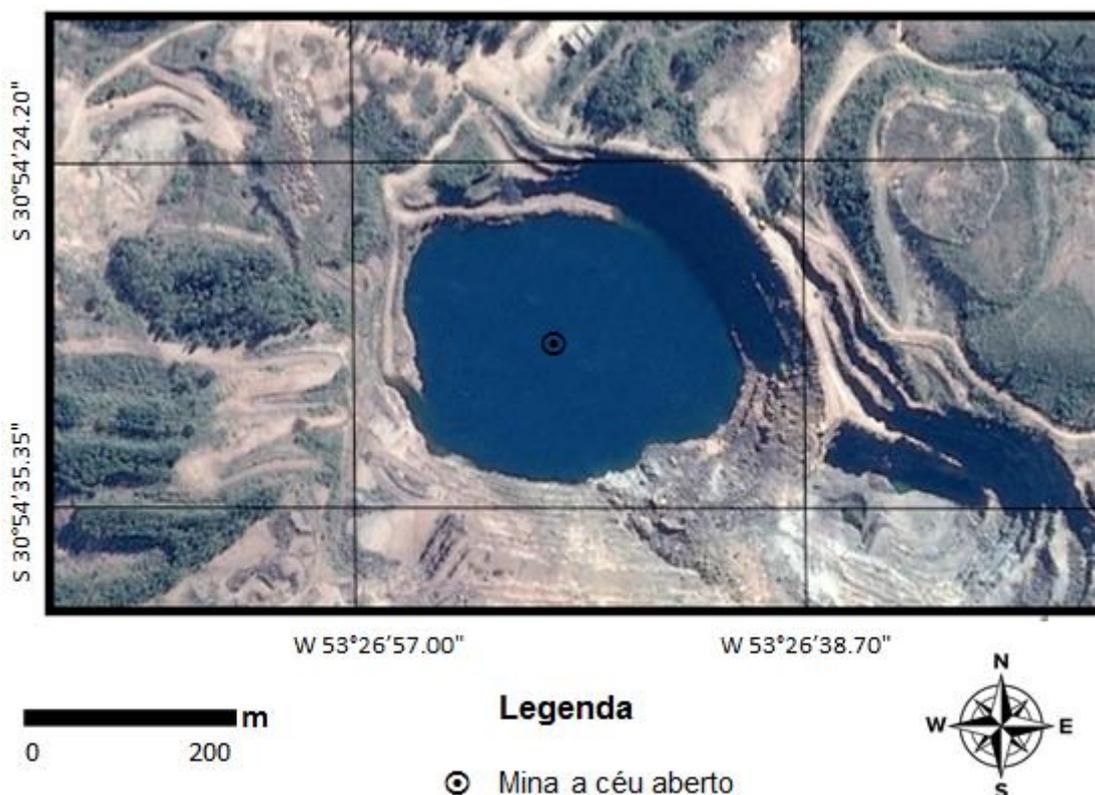
## 4.1 Estudo de campo

Nesta etapa da pesquisa, foram coletadas amostras de água da cava a céu aberto desativada, localizada nas Minas do Camaquã, na zona rural de Caçapava do Sul, para coletar as amostras de água utilizaram-se recipientes de vidro estéreis e luvas de látex, a fim de evitar qualquer contaminação externa. Foram recolhidas amostras de água superficial do entorno da área da antiga mina a céu aberto.

### 4.1.1 Área de estudo

A área de estudo está situada a cerca de 300 km de Porto Alegre-RS, em uma localidade chamada de Minas do Camaquã, no terceiro distrito do município de Caçapava do Sul, pode se observar a cava a céu aberto na figura 2.

Figura 2 – Cava a céu aberto onde foram realizadas as análises de campo.



Fonte: *Google Earth*. Data: 01 de junho de 2017.

#### 4.1.2 Identificação da presença de cobre nas amostras de água

Posteriormente a coleta, as amostras foram armazenadas na geladeira a uma temperatura de 8° C. Para análise foi utilizada a técnica de complexação da cuprizona, segundo NILSSON, 1950. A cuprizona é altamente seletiva permitindo a determinação de cobre mesmo em uma amostra que contenha a presença de diversos outros metais. Para tal, foi preparado uma solução padrão de cuprizona 5000 mg/L (0,5 %). Para a determinação do cobre nas amostras, foram adicionados 5 mL de amostra, 7,5 mL de cuprizona 0,5% e 5 mL tampão fosfato (pH 8,0) em um balão de 25 mL, completando com água deionizada. Posteriormente, foram lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. Como padrão, foi feita uma curva de calibração com sulfato de cobre pentahidratado nas concentrações de 0,1 mg/L a 5 mg/L.

Em algumas amostras foi adicionado ácido nítrico para conservar o cobre na água, impedindo o metal de se aderir ao recipiente em que a amostra está armazenada, pois o pH menor que 2 não permite que o cobre precipite ou seja adsorvido sobre a superfície sólida, mas a presença deste ácido não altera a quantidade de cobre na água, pelo contrário, apenas conserva semelhante à concentração *in situ* (APHA, 1999).

Além do método da cuprizona, as amostras de água coletadas foram analisadas no espectrômetro de fluorescência de raios-x, onde se utilizou 10 ml de água para a leitura. Para as leituras no equipamento, as amostras de água foram colocadas em sacos plásticos transparentes com auxílio de pipetas volumétricas.

#### 4.2 Estudo em *Drosophila melanogaster*

##### 4.2.1 Protocolo de exposição

Para a fase de análises “*in vivo*” utilizou-se como modelo experimental a *Drosophila melanogaster*. Para tal, as moscas foram expostas ao cobre através da diluição do mesmo no meio de cultivo, que consiste basicamente de ágar e sacarose. Primeiramente, foi elaborada uma curva de contaminação com as seguintes concentrações de sulfato de cobre: 0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 10,0 mM e 100,0 mM, utilizando três ensaios para cada concentração, com 20

moscas em cada frasco, para análise de sobrevivência. A partir desta curva, foram selecionadas as concentrações de 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM utilizando 30 moscas em cada frasco para os demais testes.

#### **4.2.2 Teste de sobrevivência**

A mortalidade das *Drosophilas* expostas ao cobre foi analisada durante um período de sete dias, a cada quatro dias as moscas eram contadas e repassadas para novos frascos, elas foram acompanhadas por um período total de dezoito dias, porém foi selecionado o período da primeira semana para apresentação.

#### **4.2.3 Avaliação da capacidade de escalada: teste comportamental**

O dano psicomotor causado pelo cobre foi avaliado através do comportamento de escalada. As moscas são anestesiadas em gelo e transportadas para tubos de ensaio marcados na altura de 8 cm. Os frascos são gentilmente balançados para que todas as moscas atinjam a base do frasco e então é cronometrado um período máximo de 10 segundos, e quantificado o número de indivíduos que chegam até a altura de 8 cm. O teste foi repetido por 10 vezes para cada concentração, sendo realizado antes e após os sete dias de contaminação das moscas (LE BOURG; LINTS, 1992). Normalmente, aquelas moscas que não apresentam danos locomotores movem-se muito rápido para o topo, enquanto aquelas com defeito locomotor são lentas no movimento e podem permanecer perto do fundo.

As moscas tratadas foram colocadas em microtubos (ependorf) e maceradas em solução tampão fosfato tendo por base a seguinte regra: 30 moscas – 300  $\mu$ L (0,095 mg de mosca por  $\mu$ L), e centrifugadas a 4000 rpm, durante 10 minutos, 4° C. O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas (atividade da enzima acetilcolinesterase e tióis livres).

#### **4.2.4 Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase**

Para a fase de análises da atividade da acetilcolinesterase, utilizou-se o reagente de Ellman (DTNB - ou Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). O DTNB é

degradado pelo produto da reação catalisado pela enzima acetilcolinesterase, formando o nitrobenzoato de cor amarela, que pode ser quantificado por espectrofotometria com absorção em 412 nm. Este método tem como objetivo quantificar a reação de hidrólise da Acetilcolina a Acetato+Colina, reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase. Desta forma, uma alíquota de 23  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada a cubeta contendo 150  $\mu\text{L}$  de acetilcolina (10 mM), 150  $\mu\text{L}$  de DTNB (10 mM) e 1177  $\mu\text{L}$  de solução tampão. A leitura ocorreu durante dois minutos com contagem a cada 15 segundos, na faixa de 412 nm (ELLMAN et al., 1961).

#### **4.2.5 Análise dos grupos tióis livres por espectrofotometria**

A análise dos grupos tióis livres (SH) permite avaliar se os íons de cobre oxidaram as ligações tiólicas, inativando enzimas e proteínas que possuem SH, caso isso ocorra pode levar a ocorrência de processos oxidativos no organismo. Para realizar este teste foi utilizado o método de Ellman (1959), com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 23  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada a cubeta contendo 150  $\mu\text{L}$  de DTNB (10 mM) e 1177  $\mu\text{L}$  de solução tampão. Após agitação as amostras foram quantificadas por espectrofotometria com absorção em 412 nm.

#### **4.2.6 Análise das espécies reativas de oxigênio por espectrofluorimetria**

Para tal, as moscas foram colocadas em microtubos (eppendorf) e homogeneizadas em solução tampão TRIS-HCL utilizando como regra a proporção 30 moscas – 300  $\mu\text{L}$  de tampão, após as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 3 minutos à 4° C. Posteriormente, foram adicionados a tubos de ensaio, 25  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante), 1965  $\mu\text{L}$  de solução tampão Tris-HCL e 10  $\mu\text{L}$  de Diclorofluoreceína (DCFH) diacetato. Por fim, as amostras foram colocadas no escuro por 30 minutos e depois lidas no espectrofluorímetro, com uma emissão de 522 nm e excitação 488 nm. Ao inserir a DCFH nas amostras ela será facilmente oxidada pelas ERO's e produzirá fluorescência, logo quanto maior a presença de ERO's maior será a fluorescência produzida pela amostra.

#### 4.2.7 Análise no espectrômetro de fluorescência de raios-x

Foi elaborada uma curva de contaminação com as seguintes concentrações: 5,0 mM, 10,0 mM e 100,0 mM, utilizando três ensaios para cada concentração, para cada ensaio um total de 100 moscas foram expostas por um período de 48 horas. Estas concentrações foram adotadas para satisfazer o limite de alcance mínimo do equipamento e o período de tempo que não causasse uma grande mortalidade nas cobaias. Após o período de contaminação, os indivíduos vivos foram adormecidos (no gelo), colocados em pequenos plásticos transparentes e as leituras de cada ensaio realizadas no espectrômetro de fluorescência de raios-x. Os resultados são obtidos em ppm. A partir deles, elaborou-se uma tabela e um gráfico para a melhor visualização da quantidade de cobre presente nos indivíduos de cada ensaio.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 5.1 Níveis de cobre na água da mina

Para estabelecer a quantidade de cobre presente na água da cava a céu aberto, primeiramente foi utilizado o método de espectroscopia de fluorescência de raios-X com a finalidade de identificar se realmente há uma ocorrência de cobre na água deste local, podemos observar a identificação da presença de cobre na água da mina na tabela 4.

Tabela 4 – Identificação de cobre na água da cava por FR-X.

| <b>Determinação de cobre na água por FR-X</b> |                                  |
|---|----------------------------------|
| <b>Ponto</b>                                  | <b>Concentração de Cobre (%)</b> |
| Cava a céu aberto                             | <b>0,0079</b>                    |
| Cava a céu aberto <sup>2</sup>                | <b>0,0068</b>                    |

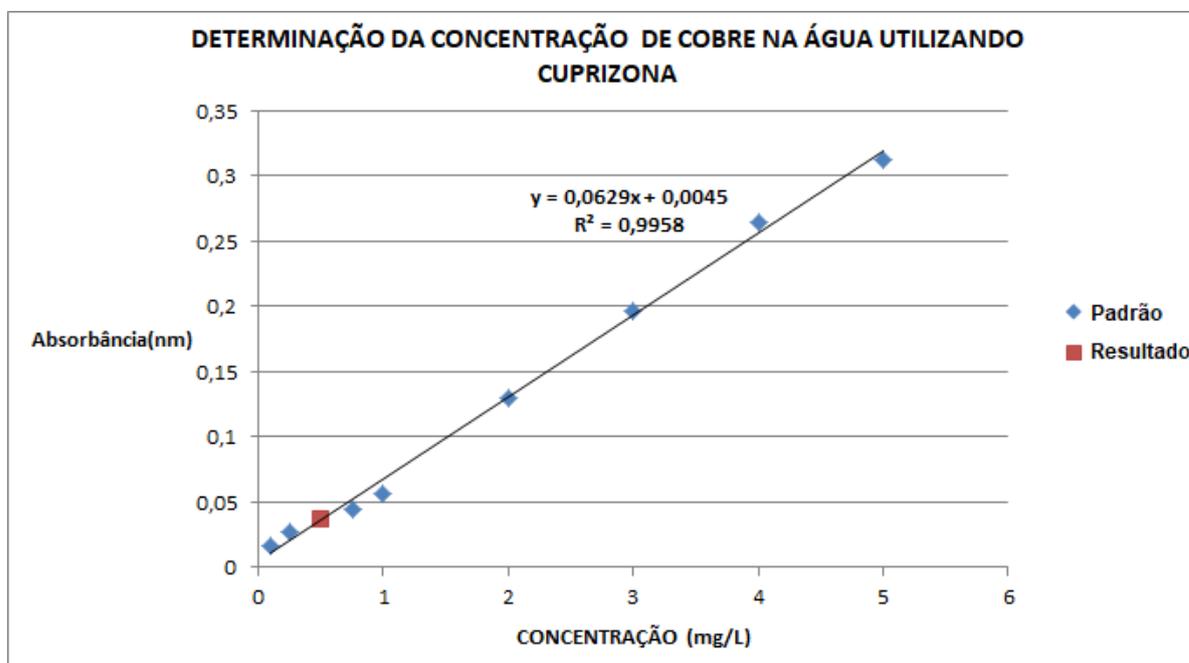
Após a confirmação da presença de cobre na água (tabela 4), partiu-se para a quantificação deste metal através do método espectrofotométrico utilizando como complexante a cuprizona. Observando a tabela 5 notamos os valores das concentrações de cobre presente nas amostras de água da área de estudo:

Tabela 5 – Concentrações de cobre na água por espectrofotometria UV-Vis.

| <b>Determinação da concentração de cobre na água utilizando cuprizona</b> |                     |                   |
|---|---------------------|-------------------|
| <b>Amostras</b>   |                     |                   |
| Ponto   | Concentração (mg/L) | Concentração (µM) |
| Cava a céu aberto   | <b>0,50</b>         | <b>2,0</b>        |
| <b>Amostras com ácido nítrico</b>   |                     |                   |
| Ponto   | Concentração (mg/L) | Concentração (µM) |
| Cava a céu aberto   | <b>0,60</b>         | <b>2,40</b>       |
| Cava a céu aberto <sup>2</sup>  | <b>0,44</b>         | <b>1,76</b>       |

Os resultados da tabela 5 foram obtidos através da curva de calibração conforme a figura 3, na qual é possível visualizar a Linha de Tendência construída a partir das absorbâncias das amostras padrão. Além disso, nesta mesma figura encontra-se a equação da reta pela qual foram calculadas as concentrações de cobre presentes nas amostras de água.

Figura 3 – Curva padrão para determinação de cobre na água.



Foi possível observar que apesar da água da cava a céu aberto estar sendo utilizada para recreação de contato primário (natação e mergulho), ela estaria sendo utilizada de forma inadequada, uma vez que, segundo a Resolução do CONAMA nº

357 de 2005, fica estabelecido que para águas de classe II, que é o caso, o máximo de cobre permitido é de 0,009 mg/L. Sendo assim, segundo esta norma, as amostras de água que foram analisadas deveriam apresentar concentrações inferiores ou iguais a 0,009 mg/L para poderem ser utilizadas para recreação de contato primário, entretanto os valores observados encontram-se acima do limite de quantidade de cobre permitido pela legislação, como é possível observar na tabela 5.

Conforme a tabela 5, o valor da concentração do cobre na água apresenta uma variação, a qual se deve ao método utilizado para analisar a amostra, porém as concentrações encontradas apresentam uma grande proximidade, sendo que a média dos três valores é 0,51 mg/L (figura 3), ou seja, está cinquenta e sete vezes acima do permitido pela legislação.

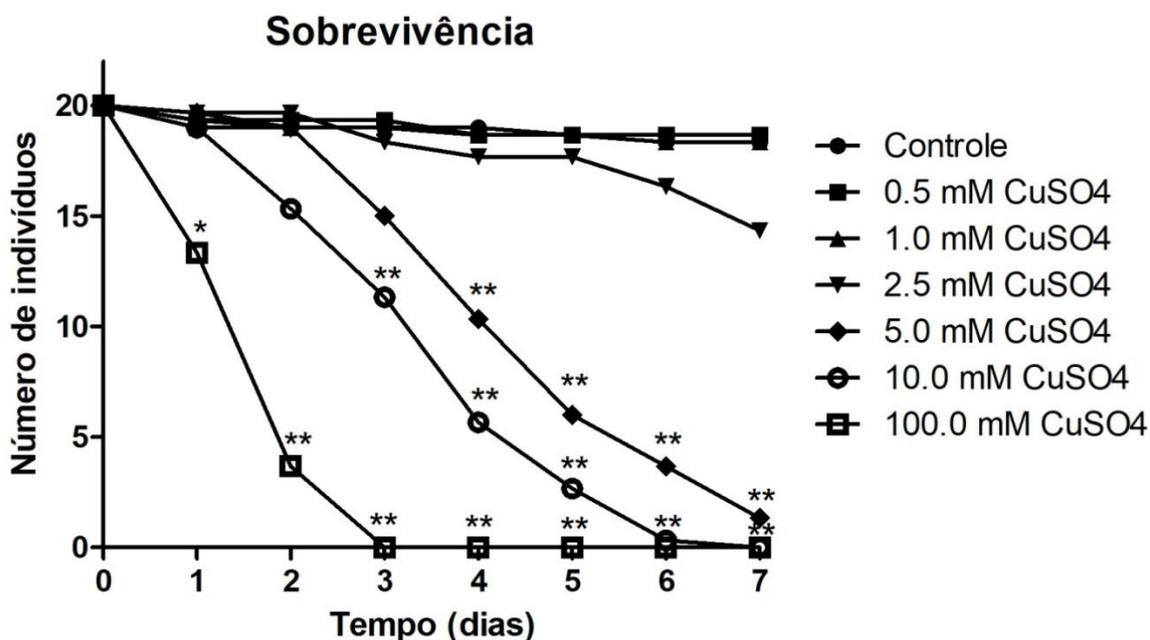
## **5.2 Efeitos tóxicos do cobre em *D. melanogaster***

Os efeitos tóxicos do cobre em *Drosophila melanogaster* foram observados sobre os parâmetros de sobrevivência e comportamento.

### **5.2.1 Efeitos tóxicos do cobre em *D. melanogaster* sobre a sobrevivência**

A mortalidade média das moscas ( $n = 3$ ), durante o período de exposição, pode ser observada a seguir, conforme a figura 4:

Figura 4 – Curva de sobrevivência de moscas expostas a diferentes concentrações de cobre no decorrer do tempo (sete dias).



Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA de duas vias (two-way ANOVA), os grupos tratados foram comparados ao grupo controle e considerados estatisticamente significativos quando \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$ .

Além dos dados estatísticos apresentados na figura 4, também foi possível observar que o grupo 5.0 mM apresentou diferença significativa de  $p < 0,001$  em relação a concentração de 0.5 mM a partir do dia 4. O grupo 10.0 mM apresentou diferença significativa com  $p < 0,001$  em relação a 0.5 mM a partir do dia 3. O grupo 100.0 mM apresentou diferença significativa com  $p < 0,001$  em relação a 0.5 mM a partir do dia 2 e  $p < 0,01$  no dia 1. O grupo 5.0 mM apresentou diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação a 1.0 mM a partir do dia 4. O grupo 10.0 mM apresentou diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação a 1.0 mM a partir do dia 3. O grupo 100.0 mM apresentou significância de  $p < 0,001$  em relação a 1.0 mM a partir do dia 2 e  $p < 0,01$  no dia 1. O grupo 5.0 mM apresentou significância de  $p < 0,001$  em relação a 2.5 mM a partir do dia 4. O grupo 10.0 mM apresentou significância de  $p < 0,001$  em relação a 2.5 mM a partir do dia 3. O grupo 100.0 mM apresentou significância de  $p < 0,001$  em relação a 2.5 mM a partir do dia 2 e  $p < 0,01$  no dia 1. O grupo 10.0 mM apresentou significância de  $p < 0,05$  em relação a 5.0 mM apenas no dia 4. O grupo 100.0 mM apresentou significância de  $p < 0,001$  em relação a 5.0 mM nos dias 2, 3 e 4 e  $p < 0,01$  nos dias 1 e 5. O grupo 100.0 mM apresentou

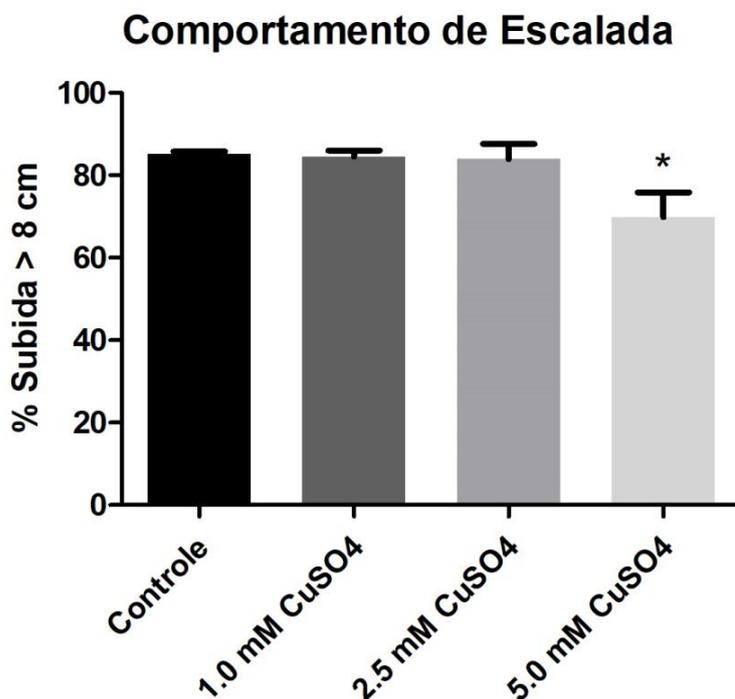
significância de  $p < 0,001$  em relação a 10,0 mM nos dias 2 e 3 e  $p < 0,01$  nos dias 1 e 4.

Na figura 4 é possível observar que a partir do primeiro dia de exposição a concentração de 100,0 mM apresentou decréscimo significativo na sobrevivência das moscas, e no dia 3 aproximadamente 100% das moscas estavam mortas. As concentrações de 5,0 mM e 10,0 mM apresentam diminuição significativa na sobrevivência a partir de 4 e 3 dias respectivamente, e no final do período de observação (7 dias) quase todos indivíduos estão mortos. As concentrações 0,5 mM, 1,0 e 2,5 mM não apresentaram diferença significativa na indução da mortalidade quando comparadas ao controle. Além disso, análises estatísticas complementares sugerem um efeito dose-dependente do cobre em causar mortalidade nas moscas. Estes resultados se assemelham ao que foi observado por Arcaya et al. (2013; 2014).

### **5.2.2 Efeitos tóxicos do cobre em *D. melanogaster* sobre o comportamento**

Com base na análise comportamental foi elaborado um gráfico com a porcentagem média de moscas que subiram acima de 8 cm, no sétimo dia de tratamento, conforme a figura 5:

Figura 5 – Comportamento de escalada das *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de cobre.



Os dados foram submetidos à ANOVA Oneway seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Comparado ao grupo controle.

Pode-se observar na figura 5 que as concentrações 0 mM, 1,0 mM, 2,5 mM não causaram efeito estatisticamente significativo na capacidade de escalada das moscas, já a concentração 5,0 mM causou uma diminuição significativa no número de indivíduos que conseguiram subir até 8cm.

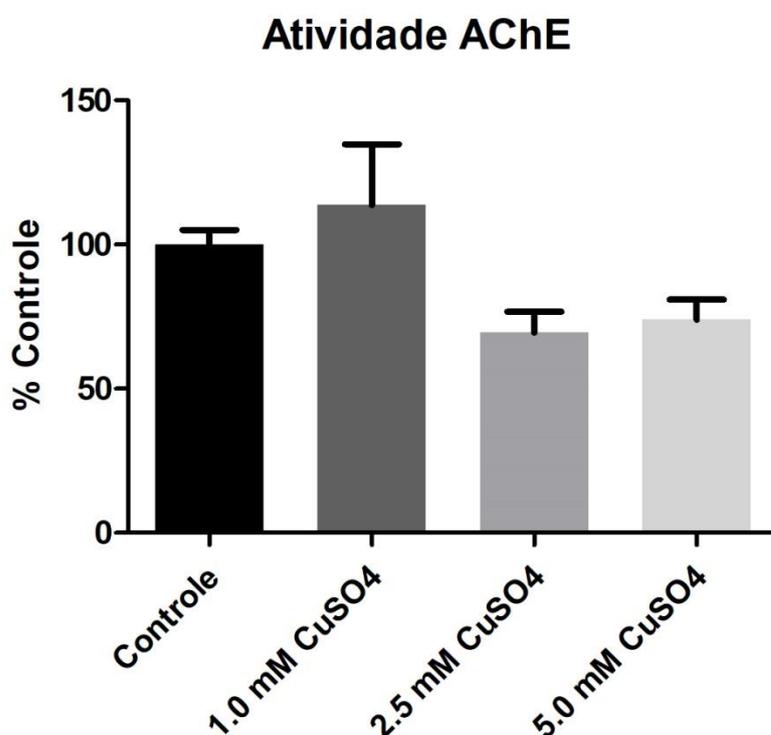
### 5.3 Mecanismos de toxicidade do cobre

Os mecanismos de toxicidade do cobre foram estudados através da avaliação da atividade da enzima AChE, da análise dos grupos SH livres, da verificação da produção de ERO's e da leitura dos níveis de cobre em *Drosophila melanogaster* por meio do método de FR-X.

### 5.3.1 Atividade da enzima acetilcolinesterase

Com o teste da atividade da enzima acetilcolinesterase foi possível notar que o cobre nas concentrações 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM não apresentaram dano significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase. Porém é possível observar uma tendência no aumento nas concentrações de 2,5 mM e 5,0 mM. Segundo dados da literatura (DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013), o cobre é um inibidor de esterases, porém só afeta a AChE de forma significativa em concentrações relativamente altas, de 10 a 20 mM em testes *in vitro*, mesmo assim a AChE apresenta uma maior sensibilidade a inibição pelo cobre, quando comparada com outras esterases, como a carboxilesterase (DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013). Dessa forma, podemos apenas sugerir que a mortalidade e o retardo na capacidade de escalada das moscas podem estar associados à inibição da atividade desta enzima, mas sem descartarmos a influência de outros fatores não estudados neste trabalho. Podemos observar o gráfico da atividade da enzima na figura 6.

Figura 6 – Atividade da enzima AChE em *D. melanogaster*.

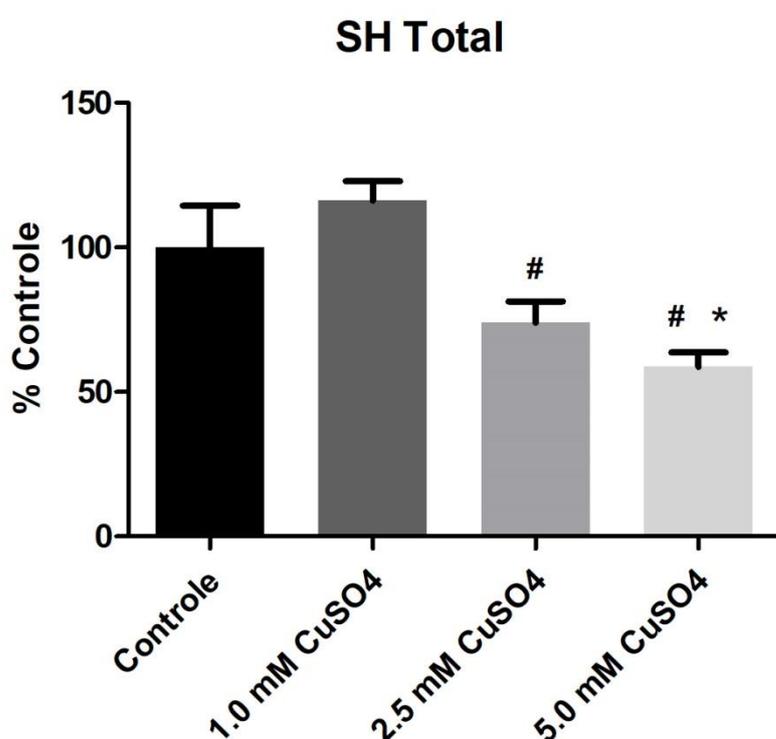


Os dados foram submetidos à ANOVA Oneway seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Não foram encontradas diferenças significativas.

### 5.3.2 Determinação dos tióis livres

Os grupos tióis (SH) estão presentes em diversas proteínas e enzimas que possuem funções importantes no organismo e quando esses grupamentos são afetados podem ocorrer graves danos no organismo dos seres vivos, pode-se observar a determinação dos tióis livres nas amostras das moscas nas diferentes concentrações na figura 7:

. Figura 7 – Determinação dos tióis livres em *D. melanogaster* tratadas com  $\text{CuSO}_4$ .



Os dados foram submetidos à ANOVA Oneway seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . \* Comparado ao grupo controle. # Comparado ao grupo 1.0 mM.

Os resultados obtidos no teste dos grupos tióis livres (figura 7) demonstram uma diminuição significativa nos níveis dos grupos tióis total nas moscas expostas a concentração de 5,0 mM de sulfato de cobre. Apesar da concentração de 2,5 mM demonstrar uma diminuição nos níveis de tióis, esse valor não foi estatisticamente significativo.

Este resultado parece estar relacionado com os resultados obtidos na curva de sobrevivência, e atividade da AChE, uma vez que o cobre liga-se aos tióis,

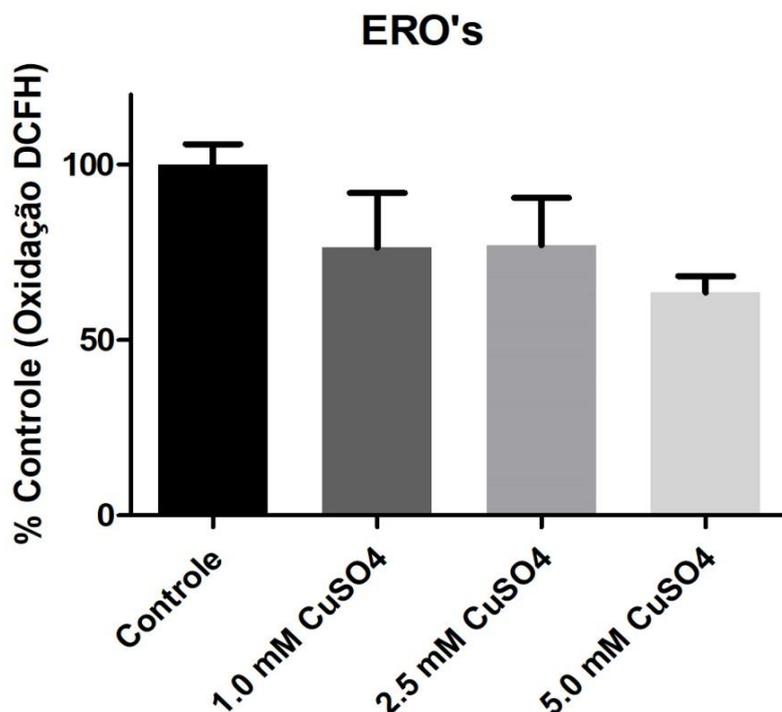
inativando proteínas e enzimas que são essenciais para o bom funcionamento do organismo, podendo causar a morte dos indivíduos contaminados (BONILLA-RAMIREZ; JIMENEZ-DEL-RIO; VELEZ-PARDO, 2011).

### **5.3.3 Produção de espécies reativas de oxigênio**

Na análise das espécies reativas de oxigênio os resultados apresentaram uma diminuição da fluorescência proporcional ao aumento das concentrações de cobre com as quais as moscas foram contaminadas, porém, esse decréscimo não foi estatisticamente significativo, como é possível observar na figura 8.

Embora inesperado este resultado pode estar associado ao fato de que para ocorrer à leitura das ERO's pela fluorescência é necessário o auxílio de enzimas esterases citoplasmáticas (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992). E as enzimas esterases estiverem inibidas (por exemplo, pelo contaminante) a oxidação da DCFH-DA tende a diminuir, e desta forma, ocorre uma diminuição na leitura da fluorescência, como um artefato na técnica. Neste caso, o cobre é um inibidor de enzimas esterases (DE LIMA; ROQUE; DE ALMEIDA, 2013), este fato também pode ser observado na figura 6, onde o aumento do cobre ocasionou uma diminuição na atividade da AChE. Porém este resultado não contradiz a problemática que quando há mais cobre no organismo, resulta em uma maior possibilidade de esse metal ligar-se aos tióis e por consequência inativar enzimas que participam da fosforilação oxidativa, ocorrendo danos neste processo e aumentando a produção de ERO's no organismo das moscas.

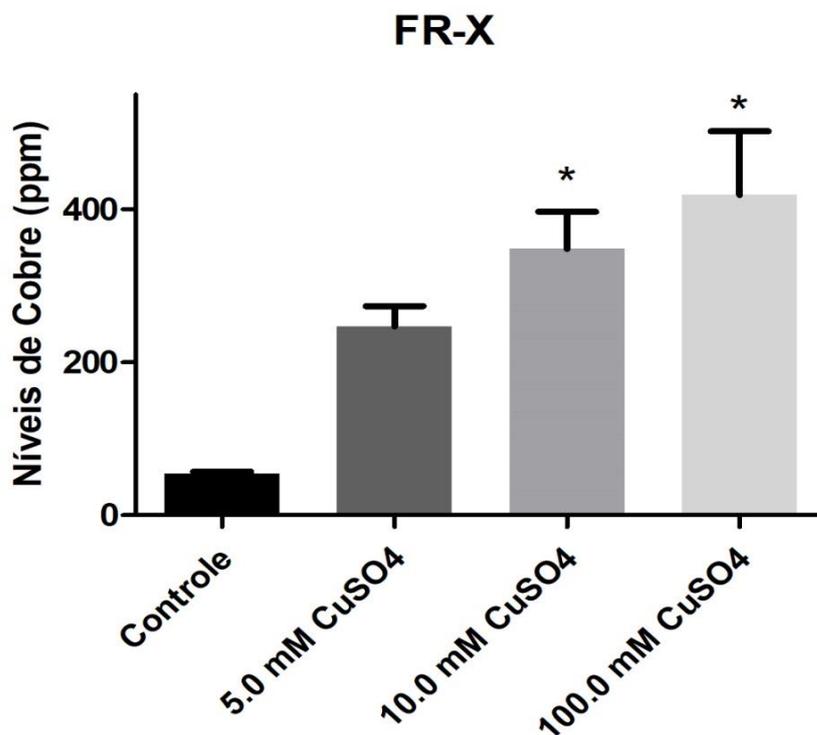
Figura 8 – Produção de espécies reativas de oxigênio.



Os dados foram submetidos à ANOVA Oneway seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Não foram encontradas diferenças significativas.

#### 5.3.4 Determinação dos níveis de cobre em *D. melanogaster* por FR-X

Com a análise das moscas no espectrômetro de fluorescência de raios-X (figura 9), foi possível identificar que o cobre ficou acumulado no organismo dos indivíduos. Esta bioacumulação já foi observada em moscas contaminadas com metilmercúrio (LEÃO et al., 2018), isto indica que quanto mais metais são consumidos indevidamente por seres vivos, mais estes se acumularam em seus organismos, podendo causar severos danos. Além disso, observou-se um aumento da presença do metal proporcional a concentração da contaminação no seu meio de cultivo. Este resultado está de acordo com o que foi observado na análise dos tióis livres, pois se mais cobre está presente no organismo, há uma maior suscetibilidade deste metal ligar-se aos tióis.

Figura 9 – Concentrações médias de cobre em *D. melanogaster*.

Os dados foram submetidos à ANOVA Oneway seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . \* Comparado ao grupo controle.

A média de indivíduos varia, pois alguns acabaram morrendo durante o período que ficaram expostos ao contaminante, devido a toxicidade de cada concentração, entretanto o método de FR-X calcula a porcentagem do metal em relação ao total de cada amostra, tornando a quantidade final de indivíduos indiferente para identificar e quantificar o cobre no organismo das moscas, isto demonstra a eficácia quantitativa e principalmente qualitativa do método.

Podemos observar na figura 9 que há aumento do metal Cu no organismo das moscas conforme o aumento da concentração. Além disso, observa-se que no grupo controle (0 mM) foi detectada uma baixa presença de cobre, o que ocorre devido a este metal estar presente naturalmente no organismo das moscas.

#### 5.4 Potencial risco toxicológico e ambiental

A concentração de cobre encontrada na água superficial da cava a céu aberto é de 0,51 mg/L (2,05  $\mu$ M), tal concentração está extremamente mais baixa do que as

concentrações utilizadas para a elaboração da curva de contaminação, pois baixas concentrações, como esta, não causam efeitos significativos no organismo das moscas, no período que foram expostas neste trabalho e nos parâmetros toxicológicos estudados. Entretanto, a exposição durante longos períodos pode levar ao processo de bioacumulação do cobre através da bioconcentração deste metal durante o tempo de vida dos indivíduos, vindo a causar efeitos negativos no organismo dos animais e vegetais que estão naturalmente em contato com este ambiente contaminado (PEDROZO E LIMA, 2001). Além disso, pode ocorrer também a intoxicação animal por cobre, a partir do consumo de gramíneas expostas a este metal, até mesmo em baixos teores, devido ao processo de biomagnificação, principalmente em casos onde há uma baixa concentração de molibdênio no solo (DIAZ GONZALEZ, 2000; BAIRD; CANN, 2011).

Neste trabalho foi analisada a presença de cobre na água superficial da cava a céu aberto, a concentração de cobre encontrada está acima da concentração permitida pela legislação vigente, Resolução CONAMA 357, porém está abaixo do limite de toxicidade do cobre para *Drosophila melanogaster*. Entretanto, a característica que o cobre e os demais metais possuem de sedimentarem-se (PEDROZO E LIMA, 2001; BAIRD; CANN, 2011), indica que com o aumento da profundidade de um sistema aquático ocorre simultaneamente um aumento na concentração de metais neste corpo hídrico. Desse modo, supõe-se que com o aumento da profundidade das águas que inundam a cava a céu aberto é possível alcançar um nível de concentração de cobre próximo às concentrações que as moscas foram expostas, tal análise da estratigrafia e distribuição do cobre nesta área pode ser realizada em pesquisas futuras.

Em casos mais extremos de contaminação de águas superficiais por cobre, devido a atividades mineradoras está o caso do rio Hrazdan na Armênia, onde é possível observar uma concentração de 21 mg/L na água (KURKJIAN, 2000). Desse modo, percebe-se que mesmo águas superficiais podem apresentar significativas concentrações de cobre, podendo atingir os organismos vivos e gerar neles efeitos tóxicos semelhantes aos observados neste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

O cobre nas concentrações testadas apresenta significativa toxicidade em moscas, podendo ser um potencial agente tóxico em situações de contaminação ambiental, além de causar efeitos nocivos em altas concentrações. Porém, essas concentrações dificilmente são encontradas em situações naturais, mas podem ocorrer em casos de contaminação. Além disso, em concentrações mais baixas como as encontradas na área de rejeito, o cobre não parece apresentar efeito tóxico no modelo experimental *Drosophila melanogaster*.

Devido a esta toxicidade do cobre, a comunidade que está em contato com as águas da mina do Camaquã, por atividades recreativas de lazer ou por serem moradores locais, está sujeita a um risco toxicológico, que poderá ser percebido somente em longo prazo. Entretanto, tal dano pode ser evitado por meio do impedimento da utilização do local como espaço para atividades recreativas de contato primário e também evitando que a população local consuma a água contaminada proveniente dessa região.

Conclui-se ainda que o método de espectroscopia por fluorescência de raios-x apresenta eficiência qualitativa para identificar o cobre em *Drosophila melanogaster* e em amostras de água, sendo de grande utilidade em locais onde se busca desenvolver pesquisa científica sem utilização de equipamentos complexos e/ou reagentes com valores elevados.

Por fim, as concentrações de cobre 0,51 mg/L encontradas na área de rejeito, extrapolam os limites para este metal na legislação vigente, indicando que esta é uma área de contaminação ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. APHA, 1999.

ARCAYA José Luis; SALAZAR U.; MORALES L.; MONCADA Y.; BONILLA E. **Lower sensitivity to copper toxicity in female *Drosophila melanogaster***. Revista de Toxicología em Linha. pág. 22-36. 2014.

ARCAYA, José Luis; TEJEDA, Carlos Mario; SALAZAR, Ubalguis; SILVA, Ernesto José; URDANETA, Karla; VARELA, Krystal. **La intoxicación con cobre disminuye la sobrevivencia e induce alteraciones neurológicas en *Drosophila melanogaster***. Investigación Clínica, v. 54, n. 1, 2013.

BAIRD, Colin; CANN Michael. **Química ambiental**. – 4 ed – . Porto Alegre: Bookman. 2011.

BALINSKI, Michael A.; WOODRUFF, Ronny C. **Differential sexual survival of *Drosophila melanogaster* on copper sulfate**. Genetica, v. 145, n. 2, p. 131-137, 2017.

BETTIOL, Wagner; CAMARGO, Otávio A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000.

BIDONE, Edison D.; LAYBAUER, Luciano; CASTILHOS, Zuleica C.; MADDOCK, John L. **Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 73, n. 2, p. 277-286, 2001.

BIER, Ethan. ***Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics**. Nature reviews. Genetics, v. 6, n. 1, p. 9-23, 2005.

BLALOCK, T. Lynn; DUNN, Michael A.; COUSINS, Robert J. **Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc**. Journal of Nutrition, v. 118, p. 222-228, 1988.

BLIGH, S. W. Annie; BOYLE, Helena A.; MCEWEN, Andrew B.; SADLER, Peter J.; WOODHAM, Robert H. **<sup>1</sup>H NMR studies of reactions of copper complexes with human blood plasma and urine**. Biochemical pharmacology, v. 43, n. 2, p. 137-145, 1992.

BONILLA-RAMIREZ, Leonardo; JIMENEZ-DEL-RIO, Marlene; VELEZ-PARDO, Carlos. **Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism**. Biometals, v. 24, n. 6, p. 1045-1057, 2011.

BRANDÃO, R.; SANTOS, F. W.; FARINA, M.; ZENI, G.; BOHRER, D.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W. **Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice**. Cell biology and toxicology, v. 22, n. 6, p. 429-438, 2006.

BREMNER, Ian. **Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper**. The Journal of nutrition, v. 117, n. 1, p. 19-29, 1987.

BRUINS, Mark R.; KAPIL, Sanjay; OEHME, Frederick W. **Microbial resistance to metals in the environment**. Ecotoxicology and environmental safety, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

CELOTTO, Alicia M.; PALLADINO, Michael J. **Drosophila**: a "model" model system to study neurodegeneration. Molecular Interventions, v. 5, n. 5, p. 292-303, 2005.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n. 357 de 17 de março de 2005**. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>> Acesso em 10 de junho de 2017.

DAHMAN, C. **Drosophila, methods and protocols**. Humana Press, 2008.

DE LIMA, Daína; ROQUE, Gabriel Meneguello; DE ALMEIDA, Eduardo Alves. **In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (Danio rerio)**. Marine environmental research, v. 91, p. 45-51, 2013.

DESCHAMPS, P.; KULKARNI, P. P.; GAUTAM-BASAK, M.; SARKAR, B. **The saga of copper (II)–l-histidine**. Coordination chemistry reviews, v. 249, n. 9, p. 895-909, 2005.

DIAZ GONZALEZ, Felix Hilario. **Indicadores sanguíneos do metabolismo mineral em ruminantes**. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. p. 31-51, 2000.

ELLMAN, George L.; COURTNEY, K. Diane; ANDRES, Jr. Valentino; FEATHERS-STONE, Robert M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**. Biochemical pharmacology, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ELLMAN, George L. **Tissue sulfhydryl groups**. Archives of biochemistry and biophysics, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

FOSMIRE, Gary J. **Zinc toxicity**. The American journal of clinical nutrition, v. 51, n. 2, p. 225-227, 1990.

GOLDSTEIN, Sara; CZAPSKI, Gidon. **The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O<sub>2</sub><sup>-</sup>**. Journal of free radicals in biology & medicine, v. 2, n. 1, p. 3-11, 1986.

Google, **Google Earth Pro Maps**. Programa Gratuito.

GOYER, Robert A.; CLARKSON, Thomas W. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of**

**Poisons**, Fifth Edition. New York: McGraw-Hill. Health Professions Division, p.691-736, 1996.

GUILHERME, L. R. G., MARQUES, J. J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, D. Q.; CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. **Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos**. Tópicos em ciências do solo, v. 4, p. 345-390, 2005.

HUGHES, Martin Neville; POOLE, Robert K. **Metals and Micro-organisms**. London: Chapman & Hall. 1989.

HWANG, Joab E. C.; BRUYNE, Marinus de; WARR, Coral G.; BURKE, Richard. **Copper overload and deficiency both adversely affect the central nervous system of Drosophila**. Metallomics, v. 6, n. 12, p. 2223-2229, 2014.

JEFFERY, W.Gordon. A world of metals: finding, making and using metals. 2nd ed. Ottawa: ICME, 2001.

KABATA-PENDIAS, Alina. **Behavioural properties of trace metals in soils**. *Applied geochemistry*, v. 8, p. 3-9, 1993.

KABATA-PENDIAS, Alina. **Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue**. *Geoderma*, v. 122, n. 2, p. 143-149, 2004.

KURKJIAN, Robert. **Metal contamination in the Republic of Armenia**. *Environmental management*, v. 25, n. 5, p. 477-483, 2000.

LAYBAUER, Luciano. **Análise das transferências de metais pesados em águas e sedimentos fluviais na região das Minas do Camaquã, RS**. Porto Alegre. 164p. Dissertação (Mestrado em Geociências), Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

LAYBAUER, Luciano. **Incremento de metais pesados na drenagem receptora de efluentes de mineração—Minas do Camaquã, Sul do Brasil**. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 3, n. 3, p. 29-36, 1998.

LEÃO, Mayara B.; DA ROSA, Paulo C. C.; Wagner, Caroline; LUGOKENSKI, Thiago H.; DALLA CORTE, Cristiane L. **Methylmercury and diphenyl diselenide interactions in Drosophila melanogaster: effects on development, behavior, and Hg levels**. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-9, 2018.

LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. **Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress**. *Chemical research in toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LE BOURG, Eric; LINTS, Frédéric A. **Hypergravity and aging in Drosophila melanogaster. 4. Climbing activity**. *Gerontology*, v. 38, n. 1-2, p. 59-64, 1992.

MANARA, R. et al. **Neuroimaging changes in Menkes disease, part 1**. *American Journal of Neuroradiology*, 2017.

MERCER, Stephen W.; LA FONTAINE, Sharon; WARR, Coral G.; BURKE, Richard. **Reduced glutathione biosynthesis in *Drosophila melanogaster* causes neuronal defects linked to copper deficiency.** Journal of neurochemistry, v. 137, n. 3, p. 360-370, 2016.

NEUMANN, Peter Z.; SASS-KORTSAK, Andrew. **The state of copper in human serum: evidence for an amino acid-bound fraction.** Journal of Clinical Investigation, v. 46, n. 4, p. 646, 1967.

MUNIZ, Daphne Heloisa de Freitas; OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. **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, p. 83-100, 2008.

NILSSON, Gustav. **A New Colour Reaction on Copper and Certain Carbonyl Compounds.** Acta Chemica Scandinavica, v. 4, n. 1, p. 205-205, 1950.

NRIAGU, Jerome O.; PACYNA, Jozef M. **Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals.** nature, v. 333, n. 6169, p. 134-139, 1988

PEDROZO, Maria de Fátima Menezes, LIMA, Irene Videira. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos.** In: Cadernos de Referência Ambiental, 002. Salvador: CRA. 2001.

PESTANA, M. H. D.; FORMOSO, M. L. L. **Mercury contamination in Lavras do Sul, south Brazil: a legacy from past and recent gold mining.** Science of the total environment, v. 307, n. 1, p. 125-140, 2003.

PESTANA, M. H. D.; LECHLER P.; FORMOSO, M.L.L.; MILLER, J. **Mercury in sediments from gold and copper exploitation areas in the Camaqua River Basin, Southern Brazil.** Journal of South American Earth Sciences, v. 13, n. 6, p. 537-547, 2000.

RISSO-DE FAVERNEY, C.; DEVAUX, A.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. P.; BAILLY, B.; RAHMANI, R. **Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species.** Aquatic Toxicology, v. 53, n. 1, p. 65-76, 2001.

RUBIN, Gerald M.; LEWIS, Edward B. **A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research.** Science, v. 287, n. 5461, p. 2216-2218, 2000.

SILVA, João Paulo Souza. **Impactos ambientais causados por mineração.** Revista espaço da Sophia, v. 8, p. 1-13, 2007.

SOUTHON, Adam; BURKE, Richard; CAMAKARIS, James. **What can flies tell us about copper homeostasis?.** Metallomics, v. 5, n. 10, p. 1346-1356, 2013.

TICKOO, Sanjay; RUSSELL, Steven. **Drosophila melanogaster as a model system for drug discovery and pathway screening**. Current opinion in pharmacology, v. 2, n. 5, p. 555-560, 2002

VIJAYALAKSHMI, M. **Drosophila melanogaster-Life Cycle**. School of Chemical and Biotechnology. SASTRA University. Thanjavur, 2013.

WAGNER, Caroline; SUDATI, Jéssie Haigert; NOGUEIRA, Cristina Wayne; ROCHA, João Batista. **In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury**. Biometals, v. 23, n. 6, p. 1171-1177, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Copper**. Geneva: WHO, 1998. (Environmental Health Criteria 200).