



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE  
COM ÁGUA DISPONIBILIZADA PARA CONSUMO HUMANO PÓS-  
ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO VIA ORAL**

ALAN CRISTIAN FIRMO NÓBREGA

BRASÍLIA, DF

2017

ALAN CRISTIAN FIRMO NÓBREGA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE  
COM ÁGUA DISPONIBILIZADA PARA CONSUMO HUMANO PÓS-  
ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO VIA ORAL**

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Vívian da Silva Santos  
Coorientadora: MSc. Natália Carvalho Guimarães

BRASÍLIA, DF

2017

ALAN CRISTIAN FIRMO NÓBREGA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE  
COM ÁGUA DISPONIBILIZADA PARA CONSUMO HUMANO PÓS-ROMPIMENTO  
DA BARRAGEM DE FUNDÃO VIA ORAL**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)  
Orientadora

---

Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza  
(Universidade de Brasília– Faculdade de Ceilândia)

---

Profa. Dra. Mani Indiana Funez  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)

BRASÍLIA, DF

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar por se fazer presente em todos os momentos, me dando força, sabedoria, discernimento e disposição para superar todos os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Veronilda Maria e José Roberto, por sempre estarem dispostos a lutar para que todos os meus objetivos sejam alcançados. Agradeço por todo o apoio, carinho e amor que vocês têm por mim, sempre acreditando no meu potencial e me incentivando nos momentos difíceis. Saibam que sou extremamente orgulhoso em tê-los como meus pais.

A todos os meus familiares que torceram para a conclusão desta fase, primos, tios e, em especial, à minha avó, Francisca Gomes, que sempre preocupada com meu bem estar me colocava em suas orações.

A minha orientadora, Dra. Vivian, pela confiança, paciência, disponibilidade e todo conhecimento transmitido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa, minha coorientadora, mestre Natália Carvalho, e Michelly Rodrigues por toda disponibilidade, empenho, dedicação e preocupação durante este um ano e meio de pesquisa, sendo essenciais para finalização desta. Acredito que este trabalho, além de ter trazido novos conhecimentos, também foi uma oportunidade de conhecer vocês, amigas que acabei desenvolvendo um grande apreço e carinho.

Aos meus amigos que me acompanharam durante a maior parte da graduação em especial à Amanda, Katherine, Anyelle, Eduardo, Jaqueline, Ana Katherine, Narla e Damyane. Agradeço por todo o companheirismo e por dividirem comigo grandes momentos de descontração, estudos, alegria e até mesmo por partilharem as dúvidas, medos e angústias quanto ao futuro. Saibam que tenho uma grande admiração por cada um de vocês.

Aos amigos que fiz durante o estágio no HUB, tornando este último semestre mais leve e menos estressante, como a Bárbara, Jéssica, Fernando, Diego, Ádria, Franco, Pollyane, Carol, Eduarda e Evelin.

A todos os meus professores por cada ensinamento, acadêmico ou de experiência de vida, e em especial à Dra. Fabiane e à Dra. Mani pelo aceite ao convite para banca.

À Universidade Católica de Brasília por ceder o espaço e os animais para conclusão deste trabalho e aos técnicos, Rafael e Vinícius, por sempre se mostrarem solícitos, auxiliando em tudo que era necessário para o desenvolvimento dos experimentos.

À Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia e ao corpo docente do curso de Farmácia, por toda dedicação e empenho para formar profissionais de saúde capacitados e qualificados.

Por fim, agradeço imensamente a todos que acreditaram em mim e de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

NÓBREGA, A. C. F. **Avaliação comportamental de ratos tratados cronicamente com água disponibilizada para consumo humano pós-rompimento da barragem de Fundão via oral.** 2017. 67f. Monografia. Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

No dia 05 de novembro de 2015, a barragem de rejeitos da mineradora Samarco em Minas Gerais (MG) se rompeu, resultando na contaminação do Rio Doce, afetando a qualidade da água destinada ao consumo e abastecimento das cidades de Colatina (ES) e Governador Valadares (MG). Estes rejeitos contêm elementos potencialmente tóxicos como os metais, que possuem um elevado potencial neurotóxico, podendo desencadear alterações neurocomportamentais relevantes. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo identificar possíveis alterações comportamentais, após ingestão crônica da água potável dos municípios de Colatina e Governador Valadares, em animais machos submetidos ao modelo do nado forçado e campo aberto. Nesse sentido, foi realizada a análise de metais nas amostras de água, usando ICP-MS, comparando com a legislação específica ao padrão de potabilidade, e os ratos *Wistar* machos foram subdivididos nos grupos controle (n=5), Colatina (n=5) e Governador Valadares (n=5), sendo registrados o consumo de água e ganho de massa corporal ao longo de 95 dias de tratamento com água potável, e em seguida submetidos ao teste do nado forçado e campo aberto. Os elementos químicos ferro e chumbo estavam elevados, segundo parâmetros da Portaria 2914/2011, estando o ferro elevado em ambos os grupos e o chumbo elevado apenas no grupo de Governador Valadares. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa em relação ao ganho de massa corporal e consumo de água entre os grupos, sendo que estes seguiam o padrão descrito na literatura. Em relação aos testes comportamentais do nado forçado e campo aberto, não foi observada diferença significativa em grande parte das variáveis analisadas, não havendo, portanto, alterações comportamentais relacionadas a depressão ou ansiedade.

**Palavras-chave:** água potável, metais, campo aberto, nado forçado, Rio Doce.

## ABSTRACT

NÓBREGA, A. C. F. **Behavioral evaluation of rats treated chronically with water made available for human consumption post-breakage of the Fundão dam via oral.** 2017. 67f. Monograph. Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

On November 5<sup>th</sup> of 2015 the tailings dam of the samarco mining company in Minas Gerais (MG) broke, causing contamination of the Rio Doce and affecting the quality of the water destined for consumption and the supply of cities in Colatina (ES) and Governador Valadares (MG). These tailings contain potentially toxic elements as metals that have a high neurotoxic potential, can initiate relevant neurobehavioral alterations. Based on this, the objective of this work identify possible behavioral changes, after chronic ingestion of drinking water from the municipalities of Colatina and Governador Valadares, in animals submitted to forced swim and open field tests. In this sense, it was made the analysis of metals in water samples, using ICP-MS, comparing potability standard to specific legislation, and male *Wistar* rats were divided into control (n=5), Colatina (n=5) e Governador Valadares (n=5) groups, being recorded the consumption of water and body mass gain, during 95 days of treatment with drinking water and then submitted to forced swim and open field tests. The chemicals elements iron and lead are high according to parameters of Portaria 2914/2011, being iron elevated in both groups and high lead only in the group of Governador Valadares. The results showed that there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) in relation to the body mass gain and consumption of water between the groups, and these followed the pattern shown in the literature. In relation to behavioral tests of forced swim and open field no significant difference was observed ( $p < 0.05$ ) in most of the analyzed variables not having, therefore, behavioral changes related to depression or anxiety.

Keywords: drinking water, metals, open field, forced swim, Rio Doce.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografia representativa do modelo do nado forçado.....	34
<b>Figura 2.</b> Fotografia representativa do modelo do campo aberto.....	35
<b>Figura 3.</b> Massa corporal dos animais ao longo do tratamento (15 semanas) .....	38
<b>Figura 4.</b> Quantidade de água consumida pelos animais ao longo do tratamento (15 semanas) expressa em mL por grama de peso.....	39
<b>Figura 5.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre o tempo de imobilidade (s) em animais submetidos ao nado forçado.....	40
<b>Figura 6.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a latência para imobilidade (s) em animais submetidos ao nado forçado.....	41
<b>Figura 7.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre o tempo de escalada (s) em animais submetidos ao nado forçado.....	43
<b>Figura 8.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de bolos fecais em animais submetidos ao nado forçado.....	44
<b>Figura 9.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a ambulação junto à parede em animais submetidos ao campo aberto.....	46

<b>Figura 10.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a ambulação junto ao centro em animais submetidos ao campo aberto.....	47
<b>Figura 11.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre frequência de cruzamentos em animais submetidos ao campo aberto.....	48
<b>Figura 12.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência levantamentos em animais submetidos ao campo aberto.....	50
<b>Figura 13.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de autolimpeza em animais submetidos ao campo aberto.....	51
<b>Figura 14.</b> Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de bolos fecais em animais submetidos ao campo aberto.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Esquema de realização dos procedimentos com a quantidade de animais utilizados e tipo de tratamento por grupo.....	32
<b>Tabela 2.</b> Concentração de metais na água dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
Al	alumínio
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
ANA	Agência Nacional de Águas
As	Arsênio
Ba	Bário
Be	Berílio
CA	Colatina
Ca <sup>+2</sup>	cálcio
Cd	Cádmio
CdCl <sub>2</sub>	Cloreto de cádmio
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr	Crômio
Cu	Cobre
DA	Doença de Alzheimer
DMT1	Metal Divalente 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Espírito Santo
FCE	Faculdade de Ceilândia
Fe	ferro
GIAIA	Grupo Independente de Avaliação de Impactos Ambientais
GV	Governador Valadares
Hg	Mercúrio
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAM	Instituto Brasileiro de Mineração
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

IEM	Indústria Extrativa Mineral
IRSN	Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
Kg	quilograma
km	quilômetro
L	litro
LTP	Potencialização a longo prazo
m	metro
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
MMSE	Mini-exame do Estado Mental
Mn	Manganês
MS	Ministério da Saúde
ND	não detectado
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
PIB	Produto Interno Bruto
PVC	Policloreto de vinila
Sb	Antimônio
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
Se	Selênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Antioxidante Superóxido Dismutase
SPAL	Serviços de Perícias e Análises Laboratoriais
TH	Tirosina Hidrolase
UCB	Universidade Católica de Brasília
UFScar	Universidade Federal de São Carlos
UnB	Universidade de Brasília
V	Vanádio
VMP	valores máximos permitidos
WHO	Organização Mundial da Saúde
Z	Zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
®	marca registrada
±	mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	<b>Mineração</b>	<b>15</b>
1.1.1	Incidente em Mariana	16
1.2	<b>Metais como agentes contaminantes de água</b>	<b>18</b>
1.2.1	Alumínio	19
1.2.2	Arsênio	21
1.2.3	Cádmio	22
1.2.4	Chumbo	23
1.2.5	Ferro	25
1.2.6	Manganês	26
1.3	<b>Testes comportamentais</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1	<b> Gerais</b>	<b>30</b>
3.2	<b> Específicos</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1	<b>Coleta das amostras de água e quantificação de metais</b>	<b>31</b>
4.2	<b>Aferição da massa corporal e quantidade de água consumida pelos animais durante o tratamento</b>	<b>31</b>
4.3	<b>Animais</b>	<b>32</b>
4.4	<b>Procedimentos experimentais</b>	<b>33</b>
4.4.1	Teste comportamental do nado forçado	33
4.4.2	Teste comportamental do campo aberto	34
4.5	<b>Análise dos dados</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
5.1	<b>Quantificação de metais nas amostras de água</b>	<b>36</b>
5.2	<b>Massa corporal dos animais e quantidade de água consumida</b>	<b>37</b>
5.2.1	Massa corporal	37
5.2.2	Quantidade de água consumida pelos animais	38
5.3	<b>Modelo do nado forçado</b>	<b>39</b>
5.3.1	Tempo de imobilidade	40
5.3.2	Latência para imobilidade	41
5.3.3	Tempo de escalada	42
5.3.4	Frequência de bolos fecais	43
5.4	<b>Modelo do campo aberto</b>	<b>45</b>
5.4.1	Ambulação junto à parede	45

5.4.2	Ambulação junto ao centro.....	47
5.4.3	Frequência de cruzamentos.....	48
5.4.4	Frequência de levantamento.....	49
5.4.5	Frequência de autolimpeza.....	51
5.4.6	Frequência de bolos fecais.....	52
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Mineração

O Brasil detém um território de extensa diversidade geológica que favorece a existência de uma ampla gama de minerais sendo, portanto, um dos maiores produtores e exportadores de minérios do mundo. Sabe-se que a atividade mineradora exerce um papel fundamental na economia do país, uma vez que as extrações destes minérios são utilizados para a fabricação e consumo de uma infinidade de produtos fundamentais para o desenvolvimento da sociedade, impactando diretamente na qualidade de vida e bem-estar da população, além de gerar inúmeros empregos e renda (IBRAM, 2015; SILVA, 2007).

Dentre os estados que sofrem maior influência da atividade mineradora destaca-se Minas Gerais, visto que a região possui solos ricos em bens minerais, aumentando consideravelmente o interesse de diversas empresas em explorar e comercializar as reservas de minério de ferro, bauxita e manganês, além de ouro e pedra sabão existentes na região. Tal estado é responsável por quase metade de todo o valor gerado pela IEM no Brasil, em torno de 44 %, contribuindo diretamente, cerca de 1,31%, no total do PIB brasileiro. (IBRAM, 2016; LANA, 2015).

No entanto, apesar de contribuir para a crescimento econômico do país, a extração destes bens minerais altera de forma intensa o território onde este se insere, gerando um grande volume de rejeitos, resíduos resultantes do processo de beneficiamento do minério, visando aumentar a qualidade e o valor econômico do produto final. Estes rejeitos contêm diversos elementos químicos, como reagentes e metais de elevado grau de toxicidade e, por isso, tendem a ser depositados em barragens de contenção a fim de manter um controle ambiental rigoroso. Contudo, caso as barragens não sejam operadas nas condições de segurança apropriadas, estas podem romper-se gerando impactos significativos ao meio ambiente, tais como, a degradação da paisagem, supressão da vegetação, dos corpos hídricos e do solo, dispersão de metais bem como o comprometimento da fauna e flora (DUARTE, 2008; SILVA, 2007).

### 1.1.1 Incidente em Mariana

No dia 5 de novembro de 2015, a barragem de rejeitos de Fundão, localizada na unidade industrial de Germano no Município de Mariana/MG, se rompeu culminando em um desastre ambiental de grande repercussão e gravidade. Após a ruptura, a lama de rejeitos foi lançada no meio ambiente atingindo a barragem de Santarém, logo a jusante, provocando seu galgamento e soterrando os distritos de Bento Rodrigues e Paracatu de Baixo, situados à poucos quilômetros das barragens. O trajeto de lama continuou de forma intensa atingindo o rio do Carmo que, após se encontrar com o rio Piranga, forma o rio Doce uma das bacias hidrográficas mais importantes do país. No dia 21 de novembro, a água de rejeitos alcançou o Oceano Atlântico, espalhando-se no litoral do Espírito Santo, impactando drasticamente cerca de 663,2 km de corpos hídricos (IBAMA, 2015; ANA, 2015).

A barragem pertencente à mineradora Samarco possuía cerca de 55 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração de ferro, dos quais, pelo menos, 34 milhões de m<sup>3</sup> foram lançados ao meio ambiente, alcançando o rio Doce em poucos dias (IBAMA, 2015). Segundo a Bowker Associates, empresa americana que realiza consultoria de gestão de riscos, o acidente é considerado como um dos maiores desastres envolvendo barragens de rejeitos de mineração do mundo, considerando registros desde 1915.

Dentre as principais consequências deste grande incidente, o qual acarretará danos de curto e longo prazo, podemos citar: mortes de diversos moradores, deslocamento da população, alteração do equilíbrio de todo ecossistema e biodiversidade local, em especial ao sistema hídrico, devastação das coberturas vegetais, morte da biodiversidade aquática e fauna terrestre, interrupção do abastecimento de água (em função da degradação da qualidade da água nos rios afetados), prejuízos à agricultura e à produção de energia nas hidrelétricas, bem como o comprometimento da pesca e do turismo (IBAMA, 2015; ANA 2015).

Logo após o rompimento a Samarco afirmou que a lama de rejeitos continha resíduos, como ferro e manganês, classificados como não inertes e não trazendo riscos para à saúde. Entretanto, tais elementos, provenientes da atividade de extração, possuem um alto risco de contaminação e toxicidade visto que estes não se degradam, tendendo a precipitar como sedimentos ou permanecer solubilizados na água, alterando drasticamente a qualidade da mesma. Vale ressaltar que mesmo

laudos indicando que a presença de metais não está relacionada aos rejeitos, a força da lama pode ter sido capaz de revolver os sedimentos de fundo dos cursos d'água, os quais já continham metais (IBAMA, 2015).

De modo a avaliar o impacto da contaminação dos recursos hídricos, foram coletadas amostras da água afetada pela lama a fim de monitorar parâmetros acerca da qualidade da mesma, principalmente no que diz respeito às concentrações de metais. Os resultados então obtidos foram comparados com a legislação vigente Resolução Conama 357/2005, a qual estabelece limites nos níveis de metais para as classes 1 e 2 de qualidade da água (destinadas ao abastecimento público) (IBAMA, 2015). Dentre os metais que estavam em inconformidade com a Resolução Conama 357/2005 pode-se citar: alumínio, bário, cálcio, cobalto, chumbo, cromo, cobre, estanho, ferro, manganês, magnésio, níquel, potássio, sódio, cobre, estanho, ferro, manganês, magnésio, níquel, potássio, sódio (IBAMA, 2015). Corroborando com estes resultados, o Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental (GIAIA) verificou em suas análises preliminares elevadas concentrações de alguns metais, estando acima do permitido pela legislação, entre eles: alumínio, arsênio, cádmio, ferro, manganês, níquel e selênio.

Cabe salientar que o rompimento da barragem de Fundão inviabilizou a captação de água do Rio Doce para abastecimento das cidades de Colatina e Governador Valadares, uma vez que altas concentrações de metais tendem a comprometer o tratamento da água para abastecimento público, levando em consideração que o tratamento do tipo convencional pode não ser capaz de remover eficientemente estes contaminantes (ANA, 2015). Desta forma, torna-se necessário a utilização de técnicas mais avançadas para tratamento da água, o que conduz na aplicação de cargas extras de produtos químicos os quais podem permanecer como resíduos na água final implicando prejuízos para o consumidor (FREITAS et al., 2002)

Nesse sentido, essa alta concentração de metais presentes na água caracteriza um risco à saúde pública, uma vez que estes tendem a acumular-se no organismo e, mesmo não provocando danos à saúde de forma imediata, muitos dos prejuízos causados são progressivos e irreversíveis.

## 1.2 Metais como agentes contaminantes de água

Os metais são elementos encontrados naturalmente no ambiente estando amplamente distribuídos no solo, sistemas aquáticos e alimentos, sendo que atividades antropogênicas e processos naturais contribuem significativamente para o aumento de sua biodisponibilidade. Dentre os processos naturais que auxiliam no aumento da concentração de metais biodisponíveis no ambiente tem-se: decomposição de rochas e lixiviação no perfil do solo, enquanto que as fontes antropogênicas estão relacionadas, particularmente, às atividades de mineração e industriais, onde estas potencializam a introdução destes elementos em quantidades indesejáveis para o meio ambiente, expondo diversos organismos, o que representa um risco potencial de contaminação (PASSAGLI, 2009).

Os indivíduos podem se expor aos metais através da via respiratória, cutânea e oral, sendo que a via de maior relevância é a oral, tendo em vista que tais elementos podem ser facilmente veiculados através da ingestão de água ou alimentos (CORTECCI, 2016).

Muitos metais são essenciais para a manutenção das funções bioquímicas e fisiológicas de diversos organismos, dentre eles podemos citar: ferro (Fe), zinco (Zn), selênio (Se), cobalto (Co) e manganês (Mn); entretanto, apesar de exercerem efeitos biológicos relevantes, estes quando em concentrações excedentes tornam-se nocivos. Outros metais não desempenham funções nutricionais ou bioquímicas, como é o caso do chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), arsênio (As) e alumínio (Al), os quais são considerados potencialmente tóxicos, uma vez que quando ingeridos em quantidades inadequadas podem levar indivíduos a uma variedade de disfunções metabólicas e sistêmicas e, em alguns casos, estados patológicos definitivos (ROBSON, 2003; PASSAGLI, 2009; FERREIRA; WERMELINGER, 2013).

Os metais, sejam essenciais ou não, possuem mecanismos de ação toxicológicos específicos sendo que sua toxicidade é dependente de diversos fatores como dose, forma física e química do elemento, via e tempo de exposição, podendo ser expressa de forma aguda ou crônica, bem como por características da população exposta, a exemplo, sexo, idade, raça, estado nutricional e fisiológico, onde a interação destas variáveis pode fazer com que o indivíduo apresente uma maior ou menor vulnerabilidade ao metal (ROBSON, 2003; TAVARES; CARVALHO, 1992).

Um dos fatores que contribuem consideravelmente para toxicidade dos metais é o fato de estes elementos não serem biodegradáveis, o que os tornam agentes potencialmente contaminantes, uma vez que ao persistirem no ambiente por longos períodos comprometem a qualidade do solo, ar, e, em especial, a água (DO AMARAL; KREBS, 2010). Sabe-se que a água é o principal constituinte do corpo humano desempenhando inúmeros papéis no organismo, de modo que o acesso da população à uma água de boa qualidade é fundamental para manutenção da saúde (JEQUIER; CONSTANT, 2010). No entanto, ao ser contaminada por metais, a água acaba tornando-se um veículo para dispersão de uma elevada quantidade destas substâncias aumentando assim a possibilidade de exposição humana.

Tendo em vista que a presença de metais em água de consumo pode gerar efeitos deletérios significativos, diversos estudos têm sido realizados a fim de elucidar a relação do mecanismo de toxicidade destes elementos com o desenvolvimento de algumas doenças de origem neurológica.

### 1.2.1 Alumínio

O alumínio (Al) é um metal comum no ambiente estando presente no solo, rochas, na argila e numa variedade de minerais. Devido à sua alta reatividade este não se apresenta na sua forma mais pura, estando frequentemente associado à hidróxidos, sulfatos e silicatos. A bauxita é o minério mais importante para obtenção deste elemento, contendo cerca de 55 % de óxido de Al (PASSAGLI, 2009; FERREIRA *et al.*, 2008).

O alumínio possui uma elevada toxicidade para o sistema nervoso central, uma vez que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e tende a se acumular no cérebro principalmente junto à glia e axônios (BONDY, 2010; PASSAGLI, 2009). Dentre os danos causados por este elemento podemos citar, inibição dos canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependente prejudicando a transmissão sináptica; prejuízo na potencialização a longo prazo (LTP), que é uma forma de armazenamento de informação sináptica estando intimamente relacionada ao mecanismo de memória; morte celular de neurônios e degeneração apoptótica de astrócitos (KAWAHARA; KATO-NEGISHI, 2011; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, 1999). Sendo assim, esse metal pode gerar diversas manifestações neurológicas, tais como encefalopatia, confusão mental, déficit de memória espacial, influencia a reatividade emocional e prejudica funções

cerebrais relacionadas ao aprendizado e memória (KAWAHARA; KATO-NEGISHI, 2011).

Devido à capacidade neurotóxica do Al vários estudos têm sugerido uma relação entre a exposição a este metal e as doenças neurodegenerativas, dentre elas a doença de Alzheimer. Sabe-se que a doença de Alzheimer é caracterizada clinicamente por distúrbios de memória e aprendizado decorrentes de deposições anormais da proteína  $\beta$ -amiloide no cérebro (DE FALCO *et al.*, 2016). Deste modo, a exposição crônica à complexos de alumínio podem potencializar a taxa de agregação e toxicidade desta proteína, intensificando a progressão da doença (BONDY, 2010; FERREIRA *et al.*, 2008).

A exposição humana ao alumínio pode ocorrer através dos aditivos alimentares, de medicamentos como antiácidos e da água de consumo (PASSAGLI, 2009). O sulfato de alumínio é usualmente utilizado no tratamento de água como agente coagulante com o intuito de reduzir a turbidez, matéria orgânica e nível de microrganismos. No entanto essa utilização, apesar de necessária, pode contribuir para o aumento da concentração deste metal na água de consumo, comprometendo sua qualidade (ROSALINO, 2011). O incidente na região de Camelford, em 1988 no Reino Unido caracteriza esse tipo de contaminação onde, acidentalmente, foi esvaziado um elevado nível de alumínio em água potável, expondo cerca de 20.000 habitantes. A população exposta apresentava sintomas relacionados a deficiências cerebrais, como perda de concentração e memória de curto prazo durante um período de 10 anos (ALTMANN *et al.*, 1999). Corroborando com estes resultados, um estudo prospectivo de coorte realizado por Rondeau e colaboradores (2009) no Sul da França teve como objetivo avaliar uma possível associação entre exposição ao alumínio presente na água potável e o risco de declínio cognitivo, demência e doença de Alzheimer. Neste estudo indivíduos idosos, com 65 anos ou mais, foram acompanhados durante 15 anos onde, para cada indivíduo, foi calculada uma ingestão média diária de Al, provindo da água potável, e as funções cognitivas foram mensuradas através do escore MMSE, um importante preditor para a demência. Os autores descobriram que o declínio cognitivo com o tempo foi superior em indivíduos com maior consumo diário de alumínio proveniente de água potável ( $>$  ou  $= 0,1$  mg/dia,  $p = 0,005$ ).

Desta forma tais estudos consolidaram uma possível associação da contaminação por Al e os sintomas característicos da doença de Alzheimer,

considerando que a concentração deste metal na água de consumo foi diretamente proporcional à incidência da doença.

### 1.2.2 Arsênio

O arsênio (As) é um metaloide de ocorrência natural sendo o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre. Está presente em mais de 200 minerais, incluindo arsênio elementar, sulfetos, óxidos, arsenatos e arsenitos (PETRUSEVSKI, 2007). A presença de arsênio na água ocorre pela dissolução de rochas e minérios, sendo que atividades humanas como mineração de metais não ferrosos, combustão de carvão e aplicação de praguicidas contribuem para a introdução deste metal no meio ambiente aquático (OGA *et al.*, 2014).

A toxicidade do arsênio é dependente da forma química em que este se encontra, sendo as formas inorgânicas as mais tóxicas. Estas são bem absorvidas através do trato gastrointestinal (cerca de 95%) e se apresentam sob a forma de arsênio trivalente (arsenito) e arsênio pentavalente (arsenato) (OGA *et al.*, 2014). O arsênio inorgânico no estado trivalente possui uma grande afinidade por grupamentos sulfidríla de proteínas e enzimas, podendo inibir diversos procesos enzimáticos importantes (glicólise, ciclo de Krebs), enquanto que a forma pentavalente pode substituir o fosfato em várias reações, interferindo diretamente no processo de fosforilação oxidativa e produção de adenosina trifosfato (PASSAGLI, 2009; KLAASSEN; WATKINS, 2012; AUSIELLO; GOLDMAN, 2009). Os compostos de arsênio são altamente solúveis e móveis na água (PETRUSEVSKI, 2007) o que torna a ingestão de água contaminada por este metal a via mais comum de intoxicação (OGA *et al.*, 2014).

A exposição aguda ao arsênio pode causar diversos efeitos tóxicos, incluindo febre, anorexia, hepatomegalia, arritmias cardíacas, vômitos e diarreias além de perda sensitiva do sistema nervoso periférico devido à degeneração walleriana dos axônios. Enquanto isso, a intoxicação crônica pode levar à câncer de pele, icterícia, podendo progredir para cirrose ou carcinoma hepatocelular, e neuropatia periférica, condição caracterizada por dormência das mãos e dos pés (AUSIELLO; GOLDMAN, 2009).

Um dos mecanismos de toxicidade induzidos por este metal está relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio, mediada por estresse oxidativo. Sabe-se que o encéfalo é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, visto que este

possui uma alta demanda de energia, alto consumo de oxigênio e membranas celulares ricas em ácidos graxos facilmente peroxidáveis (PRAKASHI, 2016; PÔRTO, 2001).

Há um interesse crescente dos efeitos de exposição ao arsênio no SNC, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que a ingestão de água contaminada com arsênio tem sido associada à diminuição do desempenho intelectual em crianças, déficits cognitivos de memória e aprendizagem, falta de concentração e transtorno de ansiedade (WANG *et al.*, 2007; GONG *et al.*, 2011; HAMADANI *et al.*, 2011).

Estudos em ratos têm comprovado que a administração de arsênio em água potável (100 mg/L de As) durante 3 semanas foi capaz de reduzir o conteúdo de dopamina e a expressão de TH (tirosina hidrolase), enzima envolvida na biossíntese de dopamina, tanto no corpo estriado quanto no córtex cerebral (Kim *et al.*, 2014). Além disso, estudo realizado por Yadav e colaboradores (2010) demonstrou que ratos expostos ao arsenito de sódio dissolvido em água destilada (20mg/kg) durante um período de 28 dias apresentaram concentrações reduzidas de adrenalina, noradrenalina, dopamina e serotonina no corpo estriado, córtex frontal e áreas do hipocampo.

Devido à capacidade do arsênio em alterar o metabolismo destes neurotransmissores, este metalóide pode causar distúrbios neurocomportamentais relevantes, uma vez que essas substâncias estão envolvidas em uma série de comportamentos, incluindo coordenação motora, emoção, motivação, humor, ansiedade, aprendizagem, atenção e memória (YADAV, 2010).

### 1.2.3 Cádmio

O cádmio é um metal tóxico de considerável preocupação ambiental. Está amplamente distribuído na crosta terrestre acumulando-se em rochas sedimentares e fosfatos marinhos (TCHOUNWOU *et al.*, 2012). A contaminação da água potável pode ocorrer como resultado da presença de cádmio em tubos galvanizados ou soldas contendo este metal em acessórios, aquecedores de água e torneiras (WHO, 2011). As principais fontes de exposição ao cádmio estão relacionadas à dieta, água potável e uso de tabaco. Devido à sua baixa proporção de excreção o cádmio possui uma meia-vida biológica longa (17-30 anos) se acumulando de forma contínua no organismo, principalmente no fígado e nos rins (SHARMA; SINGH; SIDDIQI, 2014).

Este metal possui a capacidade de induzir mutagênese, sendo que um dos mecanismos pelo qual o cádmio induz este efeito está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Devido ao aumento dos níveis de EROs, têm-se um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, gerando alteração na transmissão sináptica. Além disso, esse estresse oxidativo está associado a doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Alzheimer (SHARMA; SINGH; SIDDIQI, 2014).

As pessoas expostas cronicamente ao cádmio podem apresentar aumento da salivação, sufocação, secura na garganta, tosse, dor no peito, agitação, irritabilidade, náuseas, vômitos, disfunção renal (glicosúria e proteinúria) e falhas hepáticas. Outros sintomas incluem dor de cabeça, distúrbios de sono, déficits de memória e aprendizagem. Tais efeitos, associados ao SNC, estão relacionados a alterações nos sistemas GABAérgicos e serotoninérgicos (SHARMA; SINGH; SIDDIQI, 2014). Estudo envolvendo ratos expostos ao cádmio na água potável (5 ppm por 42 dias) durante o período de lactação e pós-desmame obtiveram níveis corticais de serotonina reduzidos (ANDERSSON *et al.*, 1997). Corroborando com tal estudo, ratos expostos ao CdCl<sub>2</sub> na água potável (25 ppm por um mês) demonstraram níveis reduzidos de serotonina, dopamina e norepinefrina em todas as regiões do cérebro 24 horas após exposição (LAFUENTE *et al.*, 2003).

Em relação às desordens comportamentais, ratos ao serem expostos por via intraperitoneal ao CdCl<sub>2</sub> em diferentes doses (1 mg/kg, 2 mg/kg e 3 mg/kg), demonstraram sintomas semelhantes à depressão, ao se observar um aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado e hipo-locomção no teste do campo aberto (HAIDER *et al.*, 2015).

Sendo assim, a exposição ao cádmio pode contribuir para o desenvolvimento de disfunções comportamentais, mediante alterações das aminas biogênicas.

#### 1.2.4 Chumbo

O chumbo é um elemento de ocorrência natural encontrado amplamente no meio ambiente, em decorrência das inúmeras atividades industriais que favorecem a distribuição deste metal (PASSAGLI *et al.*, 2009). Os compostos de chumbo são usados na manufatura de diversos produtos, o que contribui para sua presença na água potável como resultado de sua dissolução, uma vez que os sistemas de

encanamento doméstico possuem tubos de policloreto de vinila (PVC), soldas ou acessórios contendo este metal (WHO, 2011).

No entanto, o chumbo não possui nenhuma função fisiológica para o organismo, apresentando efeitos tóxicos bastante severos, em especial para o encéfalo. A exposição crônica a este metal pode afetar o sistema nervoso central, resultando em uma condição denominada saturnismo caracterizada por fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, perda de memória, alterações de humor, parestesia e linhas de deposição de sulfeto de chumbo nas gengivas (linhas de Burton). Enquanto isso, a exposição aguda pode causar sede intensa, sabor metálico, inflamação gastrointestinal, vômitos e diarreias (PASSAGLI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013).

Foi observado correlações significativas entre plumbemia (média de 11,5 µg/dL) e alterações da função intelectual e habilidade cognitiva em um grupo de 501 crianças, com idade entre seis e nove anos, residentes de Edimburgo (Escócia) após ingestão de água potável contaminada pelo chumbo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). A exposição ao chumbo durante a infância foi capaz de diminuir o volume cerebral na vida adulta, em especial da matéria cinzenta. As regiões afetadas incluem porções do córtex pré-frontal e o córtex cingulado anterior, estruturas responsáveis por funções cognitivas, executivas, regulação de humor e tomada de decisão (CECIL *et al.*, 2008).

O aumento da exposição ao chumbo contribui para etiologia da depressão e transtorno de pânico em adultos jovens dos Estados Unidos. Um dos mecanismos que poderiam explicar tal associação envolve perturbação na neurotransmissão monoaminérgica, uma vez que depressão e ansiedade estão fortemente associados com perturbação desse sistema (BOUCHARD *et al.*, 2009). Ratos expostos ao chumbo na água potável (500 ppm de acetado de chumbo) durante 5 semanas demonstraram comportamentos depressivos, devido ao aumento do tempo de imobilidade no nado forçado e uma diminuição nos níveis de serotonina no encéfalo (HAIDER *et al.*, 2013).

Estes achados sugerem que a neurotoxicidade do chumbo pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento de doenças neurocomportamentais.

### 1.2.5 Ferro

O ferro é um mineral essencial para inúmeras funções do organismo e está envolvido no transporte de oxigênio, síntese de DNA, respiração mitocondrial, além de ser utilizado na síntese da hemoglobina nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (GROTTO *et al.*, 2008). Este metal desempenha um papel fundamental no desenvolvimento cerebral, uma vez que as concentrações de ferro se encontram elevadas na substância negra e gânglios da base, áreas altamente influenciadas pela dopamina (KIM; WESSLING-RESNICK, 2014). Além disso, o ferro é cofator da tirosina hidroxilase e da triptofano hidroxilase, enzimas responsáveis pela síntese de dopamina e serotonina, respectivamente (BEARD; CONNOR, 2003).

A deficiência de ferro pode alterar a função cognitiva e levar a déficits comportamentais. Estudo em crianças que apresentaram deficiência de ferro exibiam comprometimento da função motora e de processos cognitivos associados a indícios de depressão e ansiedade (LOZOFF *et al.*, 2000). A carência de ferro pode levar ao aumento da absorção de manganês, cádmio e chumbo, visto que a absorção gastrointestinal destes metais divalentes pode ser feita através do transportador de metal divalente 1 (DMT1). Dentre esses metais, tanto o manganês como o chumbo podem afetar negativamente o desenvolvimento neurológico de crianças (KIM; PARK, 2014).

Em contrapartida, a sobrecarga de ferro pode gerar estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio, acarretando na peroxidação lipídica do encéfalo e oxidação de proteínas. O aumento dos níveis de ferro, particularmente na região do córtex parietal, nos estágios iniciais da doença de Alzheimer possuem uma correlação positiva com a gravidade do comprometimento cognitivo (ZHU *et al.*, 2009) além de contribuir, através do estresse oxidativo, na deposição anormal da proteína  $\beta$ -amiloide nas placas senis na doença de Alzheimer (SALVADOR; URANGA; GIUSTO, 2010). A sobrecarga de ferro também altera a homeostase dos neurotransmissores, uma vez que infusões de ferro na substância negra comprometem os sistemas dopaminérgicos e conseqüentemente conduzem à déficits motores semelhantes à doença de Parkinson. Desta forma, o ferro em excesso tem uma implicação direta no desenvolvimento e progressão destas doenças neurodegenerativas (SALVADOR; URANGA; GIUSTO, 2010).

Em relação a alterações comportamentais, Maaroufi e colaboradores (2009) demonstraram que a administração de sulfato ferroso em ratos adultos (3 mg/kg durante 5 dias) por via intraperitoneal induziu um comportamento ansiogênico, sendo observado no labirinto de cruz elevado e campo aberto. Além disso, foi encontrado aumento nos níveis de ferro em regiões do cérebro envolvidos em processos emocionais, incluindo córtex frontal, gânglios da base, hipocampo (centro da memória espacial) e cerebelo. Com isso, o aumento do estresse oxidativo devido à sobrecarga de ferro poderia afetar o sistema dopaminérgico, podendo causar alterações comportamentais pertinentes.

### 1.2.6 Manganês

O manganês (Mn) é o quinto elemento mais abundante na terra estando frequentemente associado a óxidos e carbonatos, sendo o dióxido de manganês a sua forma mais comum. Está presente no ar, solo, água e alimentos (arroz, nozes e grãos integrais) sendo a ingestão a principal via de exposição (ATSDR, 2000; ERIKSON *et al.*, 2007). É considerado um nutriente essencial, uma vez que mantém o bom funcionamento de diversos processos fisiológicos, tais como, produção de glicose, coagulação do sangue, cicatrização de feridas e formação de cartilagem e ossos. Além disso, é cofator de muitas enzimas importantes, incluindo a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), enzimas envolvidas no metabolismo das proteínas (arginase) e carboidratos (piruvato carboxilase) e ativação da glicosiltransferase, relacionada à formação de mucopolissacarídeos utilizados pela cartilagem e ossos (ASCHNER, 2000; ERIKSON *et al.*, 2007).

Embora seja um metal essencial em concentrações mínimas, a exposição excessiva ao manganês pode causar uma disfunção grave no SNC conhecido como manganismo. Este distúrbio neurológico é caracterizado por sintomas que incluem tremores, déficits de humor e memória (O'NEAL *et al.*, 2014), dificuldade para caminhar e espasmos musculares faciais; seguido por um período de agressividade, irritabilidade e alucinações (ASCHNER, 2000; BOUABID, *et al.*, 2014). O excesso de manganês atinge o sistema nervoso central através do transportador de metal divalente 1 (DMT1). Este transportador é expresso em níveis elevados nos gânglios da base (estrutura relacionada à atividade motora), tornando essa região mais susceptível ao acúmulo de manganês. Indivíduos que possuem deficiência de ferro

têm um risco aumentado de intoxicação por manganês, uma vez que este compete pelos mesmos transportadores do ferro, incluindo o DMT1 (PERES *et al.*, 2016; CHEN; CULBRETH; ASCHNER, 2016).

A exposição a níveis elevados de Mn na água potável tem sido associada a um menor desempenho de memória, atenção e funções motoras (OULHOTE, *et al.*, 2014) além de deficiências intelectuais (BOUCHARD *et al.*, 2011) em crianças em idade escolar. Estudo realizado por Lao e colaboradores (2017) demonstrou que crianças expostas cronicamente ao manganês através da água potável apresentaram um acúmulo deste metal nos núcleos da base, sendo detectado por meio de ressonância magnética, podendo implicar em déficits no desempenho motor.

O acúmulo de manganês nos núcleos da base exerce um efeito citotóxico sobre os neurônios dopaminérgicos induzindo neurodegeneração e diminuição da dopamina extracelular. A dopamina está envolvida em uma série de processos, incluindo atividade motora, motivação, humor, atenção e aprendizagem. Como consequência, qualquer alteração na neurotransmissão dopaminérgica poderia provocar distúrbios comportamentais, tais como depressão e ansiedade (JONES, 2008; ADLI *et al.*, 2014).

### **1.3 Testes comportamentais**

A depressão é caracterizada por duas ou mais semanas de humor deprimido associado à uma série de sintomas, tais como diminuição do apetite e libido, anedonia, alterações psicomotoras e do sono, concentração reduzida e culpa excessiva (ALBERT; BENKELFAT; DESCARRIES, 2012). Estes sintomas podem ser explicados por meio da hipótese monoaminérgica a qual propõe que os níveis reduzidos de serotonina, dopamina e noradrenalina no cérebro estão relacionados às manifestações clínicas da depressão (YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

Muitos metais são capazes de alterar as concentrações de monoaminas no cérebro de modo que a exposição excessiva a esses elementos pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurocomportamentais. Nesse sentido, a fim de avaliar a neurotoxicidade dessas substâncias bem como compreender a fisiopatologia das doenças de origem neurológica, tem-se a necessidade de utilizar os modelos animais como ferramentas capazes de reproduzir no animal alterações semelhantes àquelas que podem ser observadas em seres humanos (FUNCHAL; DANI, 2014).

Dentre o teste preditivo de depressão e os neurotransmissores implicados nesse processo, temos o modelo do nado forçado proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977. Nesse modelo os ratos são colocados em um tanque cilíndrico com água sendo forçados a nadar para sobreviver dessa situação aversiva. O teste se baseia na observação do comportamento de imobilidade, adotado pelo animal após inúmeras tentativas de escapar, de modo que tal postura é interpretada como um estado de desamparo assemelhando-se a alguns sinais de depressão em humanos (FUNCHAL; DANI, 2014; YIN; GUYE; DIETIS, 2016).

Além disso, a fim de medir a capacidade ansiogênica, bem como atividade locomotora e comportamento exploratório do animal, temos o teste do campo aberto criado por Hall e Ballachey, em 1932. Neste teste, os ratos são posicionados no centro de uma arena aberta com o piso dividido em vários quadrantes, a fim de quantificar a atividade locomotora. Os animais que demonstram comportamentos ansiogênicos apresentam baixa atividade motora e uma tendência a permanecer nas regiões laterais do equipamento, postura denominada de tigmotaxia. (FUNCHAL; DANI, 2014; PRUT; BELZUNG, 2003). O comportamento de ansiedade no campo aberto é desencadeado por dois fatores: o teste individual (uma vez que o animal é separado do seu grupo social) e agorafobia (tendo em vista que a arena é muito grande em relação a reprodução do animal ou seu ambiente natural) (PRUT; BELZUNG, 2003).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Diante do incidente com a barragem da mineradora Samarco, o qual atingiu a bacia hidrográfica do Rio Doce, afetando drasticamente a qualidade da água destinada ao consumo dos municípios de Governador Valadares e Colatina, e tendo em vista que a neurotoxicidade induzida por metais pode desencadear alterações neurocomportamentais relevantes, torna-se necessário a utilização dos modelos animais como ferramentas capazes de reproduzir no animal alterações semelhantes àquelas que poderão ser observadas em seres humanos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Identificar possíveis alterações comportamentais diante da exposição de ratos machos da linhagem *wistar* (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) a testes comportamentais do nado forçado e campo aberto, após ingestão crônica de água de abastecimento dos municípios de Colatina e Governador Valadares.

#### 3.2 Específicos

- Determinar a concentração de metais presentes em amostras de água disponíveis para consumo humano dos municípios de Governador Valadares, Colatina, bem como da UCB utilizadas para o tratamento dos animais.
- Avaliar o consumo de água e a massa corporal dos animais ao longo do tratamento.
- Avaliar o tempo de imobilidade, latência para imobilidade, bem como a frequência de bolos fecais e tempo de escalada em animais submetidos ao modelo do nado forçado.
- Avaliar a frequência de ambulação junto ao centro, frequência de ambulação junto à parede, de cruzamentos entre quadrantes, frequência de levantamento, de autolimpeza e de bolos fecais, em animais submetidos ao modelo do campo aberto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras de água e quantificação de metais

As amostras de água foram coletadas diretamente da torneira, durante a Expedição do GIAIA realizada por pesquisadores da UFSCar e UnB/FCE em dezembro de 2015 (GV) e março de 2016 (Colatina). Em seguida, as amostras foram armazenadas, em galões de plástico, identificadas e mantidas resfriadas em geladeira até o momento dos testes e tratamento dos animais. Durante o tratamento tais amostras foram transferidas para a mamadeira dos animais, de acordo com o grupo correspondente, sendo utilizada *in natura* sem nenhum processo de filtragem.

A quantificação dos metais nas amostras de água foi realizada no Serviço de Perícias e Análises Laboratoriais (SPAL), no Complexo da Polícia Civil do Distrito Federal.

Para a determinação das concentrações dos metais prata ( $^{107}\text{Ag}$ ), arsênio ( $^{75}\text{As}$ ), bário ( $^{138}\text{Ba}$ ), berílio ( $^9\text{Be}$ ), cádmio ( $^{111}\text{Cd}$ ), cromo ( $^{52}\text{Cr}$ ), cobre ( $^{63}\text{Cu}$ ), ferro ( $^{56}\text{Fe}$ ), manganês ( $^{55}\text{Mn}$ ), níquel ( $^{60}\text{Ni}$ ), chumbo ( $^{208}\text{Pb}$ ), antimônio ( $^{121}\text{Sb}$ ), selênio ( $^{82}\text{Se}$ ), vanádio ( $^{51}\text{V}$ ) e zinco ( $^{66}\text{Zn}$ ) nas amostras de água, utilizou-se espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) NexION 300D Perkin Elmer®, Norwalk, CT (EUA). Houve a necessidade de diluição da água em  $\text{HNO}_3$  2% 1:10 (v/v).

Foi realizado um *screening* para verificar quais os possíveis metais estariam em concentrações alteradas de acordo com a legislação vigente Portaria 2914/2011 para água de abastecimento.

### 4.2 Aferição da massa corporal e quantidade de água consumida pelos animais durante o tratamento

Ao longo do tratamento a massa corporal e a quantidade de água consumida pelos animais foram registradas com o intuito de se verificar a aceitabilidade da água de tratamento bem como possíveis alterações na massa corporal, que poderiam modificar a homeostase dos animais e vir a comprometer as análises dos testes comportamentais. A pesagem dos animais foi realizada duas vezes por semana

utilizando uma balança comercial da marca Filizola BP 15 com capacidade máxima de 15 kg. A quantidade de água consumida foi medida, utilizando-se garrafas preenchidas com 350 mL de água, nas quais a variação de volume foi verificada duas vezes por semana por meio de provetas graduadas de 500 mL.

### 4.3 Animais

Foram utilizados um total de 15 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, pertencentes à linhagem *wistar*, provenientes do biotério do Laboratório de Processos Básicos e Psicologia da Universidade Católica de Brasília (Brasília, DF, Brasil). Tais animais foram alojados individualmente em caixas de polietileno preenchidas com maravalha, sendo mantidas em salas com estantes climatizadas, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (realização do experimento na fase clara entre 6h às 18h) com luz de intensidade entre 250 e 500 LUX a 76cm do piso do ambiente, mediante temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade do ar de 55%, tendo livre acesso à alimentação e água de tratamento. Os animais foram divididos em 3 grupos de 5 animais, conforme descrito na tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Esquema de realização dos procedimentos com a quantidade de animais utilizados e tipo de tratamento por grupo:

Grupo	Quantidade de Animais	Tratamento
Grupo 1 (Controle)	5	Água de abastecimento do biotério da UCB
Grupo 2 (GV)	5	Água de abastecimento de Governador Valadares
Grupo 3 (CA)	5	Água de abastecimento de Colatina

Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas no National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, sendo o

projeto submetido ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Católica de Brasília (UCB) e aprovado (Protocolo nº 003/16)

#### **4.4 Procedimentos experimentais**

Os animais foram tratados com água de abastecimento de Governador Valadares, Colatina e UCB (controle) por um período de 95 dias, correspondente à toxicidade crônica (KLAASSEN; WATKINS, 2012). No 96º dia procedeu-se ao teste do nado forçado e campo aberto, conforme descrito abaixo.

##### **4.4.1 Teste comportamental do nado forçado**

Para realização do nado forçado, cada animal foi submetido ao modelo por dois dias consecutivos, respeitando o mesmo horário de exposição. Inicialmente os animais passaram por um período de treino, 24 horas antes da realização do teste a fim de ambientá-los. O treino consistiu em colocar os animais, individualmente, em um recipiente cilíndrico de 50 cm de altura, sem apoio lateral ou basal, com cerca de 40 cm de água e 45 cm de diâmetro (fig. 1) a uma temperatura de  $24 \pm 1$  °C, controlada com o auxílio de um aquecedor e termômetro. Os animais permaneceram no treino durante 15 minutos, sendo então retirados da água, secados com uma toalha e colocados em uma gaiola individual à temperatura ambiente, para em seguida retornarem à gaiola de origem. Após 24 horas da realização do treino, foi feito o teste que consistiu em colocar o animal novamente no recipiente com água, na mesma temperatura de  $24 \pm 1$  °C, ao longo de 5 minutos. Durante este tempo foram avaliados os comportamentos relacionados ao tempo de imobilidade do animal, latência para a imobilidade, além do tempo de escalada e frequência de bolos fecais, sendo filmados para posterior análise. Entre a exposição de um e outro animal o recipiente era esvaziado, limpo com uma solução de álcool 70 % e a água trocada, tanto no treino como no teste, de modo a evitar que odores estressores do animal anterior interferissem sobre o comportamento do animal subsequente (FUNCHAL; DANI 2014). Vale ressaltar que o ambiente era o mais silencioso possível de forma a evitar interferências sobre os comportamentos naturais dos animais (FUNCHAL; DANI,

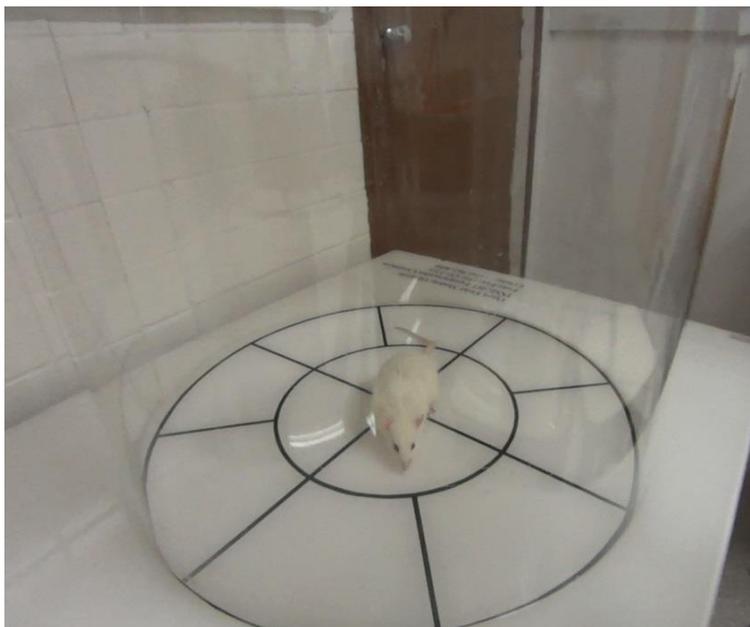
2014). Após finalizado o teste os animais foram retirados da água, secados e posteriormente submetidos ao teste do campo aberto.



**Figura 1.** Fotografia representativa do modelo do nado forçado

#### 4.4.2 Teste comportamental do campo aberto

O teste do campo aberto foi efetuado imediatamente após o teste do nado forçado. Para tal os animais foram colocados, individualmente, no centro de uma arena circular, circundada por paredes, com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura (fig. 2). O assoalho, subdividido em 12 secções concêntricas, permitiu a quantificação da frequência de ambulação do animal, a qual era considerada quando o mesmo invade, com as 4 patas, o quadrado adjacente (FUNCHAL; DANI, 2014). Os animais permaneceram no campo aberto ao longo de 5 minutos, enquanto seus comportamentos eram filmados para posterior análise. Os parâmetros registrados foram os seguintes: frequência de ambulação junto ao centro; frequência de ambulação junto à parede; frequência de cruzamentos entre quadrantes; frequência de levantamento; frequência de autolimpeza; frequência de bolos fecais. O campo aberto foi cuidadosamente limpo após cada teste com uma solução de álcool 70% e seco. O ambiente onde foi realizado o teste era o mais silencioso possível de modo a evitar interferências sobre os comportamentos naturais dos animais (FUNCHAL; DANI, 2014)



**Figura 2.** Fotografia representativa do modelo do campo aberto

#### **4.5 Análise dos dados**

Testes estatísticos foram realizados de acordo com a distribuição dos dados, à partir da avaliação da simetria. Se a distribuição dos dados seguiu a normalidade, o teste aplicado foi ANOVA e *post hoc* Tukey; se os dados mostraram ter distribuição anormal, o teste aplicado foi Kruskal-Wallis e *post hoc* Dunn's. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os gráficos foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism® 6 e os resultados avaliados pelo STATISTICA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Quantificação de metais nas amostras de água

Os metais Fe e Pb se apresentaram alterados quando comparados com a legislação vigente (Portaria 2.914/2011), conforme observado na tabela 2. Vale ressaltar que alguns elementos ficaram abaixo do limite de detecção.

**Tabela 2.** Concentração de metais na água dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

Elemento ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	C	GV	CA	Portaria 2914/2011
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	VMP <sup>&amp;</sup>
Ag	1,15 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,66 <sup>a,b</sup>	0,49 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	-
As	<7.10 <sup>-6</sup>	<7.10 <sup>-6</sup>	<7.10 <sup>-6</sup>	10,00
Ba	3,16 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	40,16 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	143,80 $\pm$ 0,42 <sup>c</sup>	700,00
Be	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	-
Cd	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	5,00
Cr	0,32 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,73 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	50,00
Cu	208,20 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 3,73 <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	2.000,00
Fe	287,10 $\pm$ 21,24 <sup>a</sup>	546,40 $\pm$ 21,24 <sup>b</sup>	301,60 $\pm$ 14,00 <sup>a</sup>	300,00
Mn	0,52 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	41,31 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	<2.10 <sup>-6</sup>	100,00
Ni	<1,7.10 <sup>-5</sup>	0,58 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	70,00
Pb	1,63 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	14,45 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	<4.10 <sup>-6</sup>	10,00
Sb	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,25 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	5,00
Se	<1,45.10 <sup>-4</sup>	<1,45.10 <sup>-4</sup>	1,12 $\pm$ 0,06	10,00
V	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,35 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	-
Zn	97,82 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>	314,93 $\pm$ 6,69 <sup>b</sup>	33,16 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	5.000,00

VMP=valor máximo permitido; C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

<sup>&</sup>Os VMP foram convertidos para  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para melhor visualização dos dados.

Usou-se ANOVA, com *post hoc* Tukey.

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ( $p < 0,05$ ).

O padrão de potabilidade da água é expresso pela Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914/2011, a qual estabelece normas e procedimentos de controle e de

vigilância da qualidade da água para consumo humano, dispondo, dentre outros parâmetros, sobre os valores máximo permitidos (VMP) de elementos químicos presentes na água potável (BRASIL, 2011). Desta forma, as concentrações de metais nas amostras de água foram comparadas com o VMP estabelecido pela legislação, podendo observar que o metal ferro (Fe) se apresentou elevado em ambos os grupos, enquanto que o metal chumbo (Pb) estava elevado apenas no grupo de Governador Valadares.

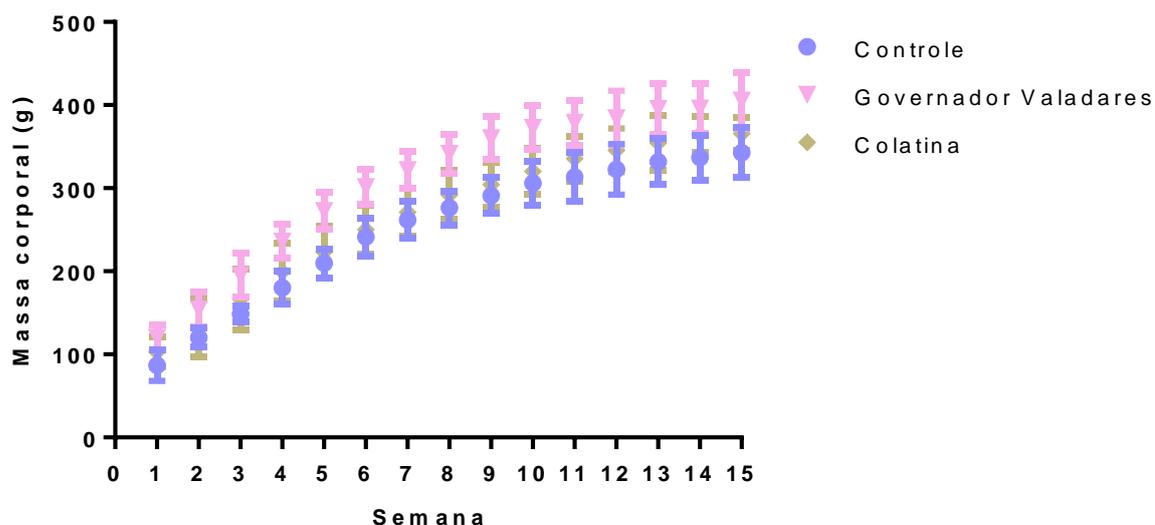
Os compostos de chumbo são usados na manufatura de diversos produtos, o que contribui para a sua presença na água potável como resultado de sua dissolução, uma vez que os sistemas de encanamento doméstico possuem tubos de policloreto de vinila (PVC), soldas ou acessórios contendo este metal (WHO, 2011), o que poderia explicar a presença de chumbo residual na água de Governador Valadares.

Em relação ao ferro, o mesmo pode ser usado como agente coagulante em instalações de tratamento de água ou então fundidos ao aço e tubos galvanizados, utilizados para distribuição da mesma (WHO, 2003), contribuindo para presença de resíduos de ferro na água potável. Vale ressaltar que a barragem de Fundão liberou cerca de 34 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos de mineração de ferro (IBAMA, 2015), o que pode ter contribuído para o aumento dos níveis de ferro encontrados em ambos os grupos, uma vez que o tratamento do tipo convencional pode não ser capaz de remover de forma eficiente estes contaminantes (ANA, 2015).

## **5.2 Massa corporal dos animais e quantidade de água consumida**

### **5.2.1 Massa corporal**

Todos os animais apresentaram ganho de massa corporal constante ao longo das 15 semanas de tratamento não havendo diferença significativa dos grupos em relação ao controle, conforme pode ser observado na figura 3.

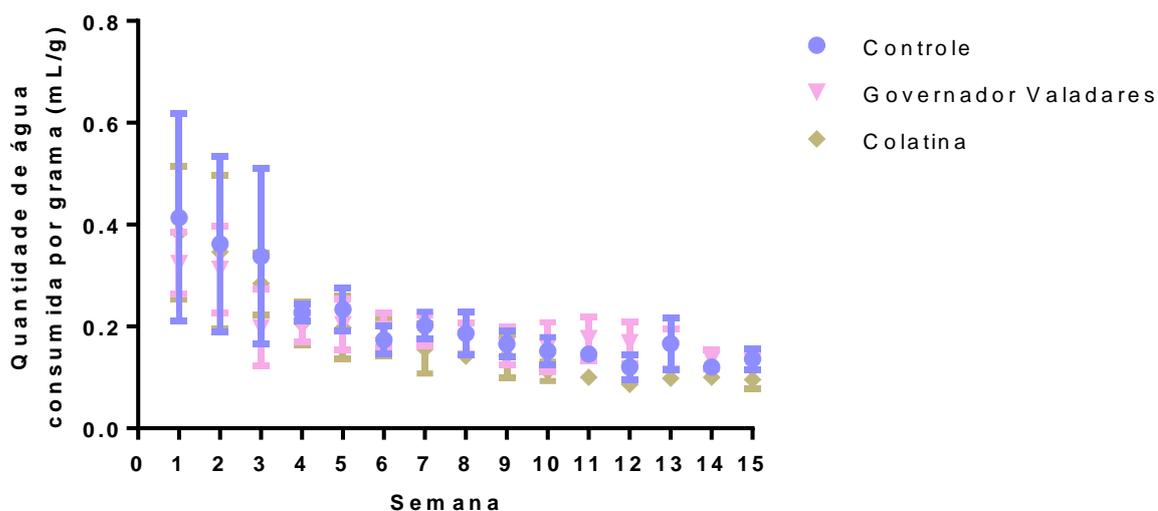


**Figura 3** - Massa corporal dos animais ao longo do tratamento (15 semanas). O erro padrão da média está representado pelas barras verticais. Controle (n = 5), Governador Valadares (n = 5) e Colatina (n = 5).

Nas semanas iniciais (semana 1 à 8) os animais obtiveram cerca de 30 g à 20 g, a cada semana, enquanto que nas semanas finais (semana 9 à 15) obtiveram um ganho de massa corporal em torno de 10 g, por semana. De modo geral, esta é uma tendência na evolução ponderal de ratos *wistar*, uma vez que houve um ganho de peso constante que, inicialmente, se mantém acelerado e, ao decorrer, tende a desacelerar gradativamente mantendo uma relativa estabilidade assintótica (TOMANARI; PINE; SILVA, 2003).

### 5.2.2 Quantidade de água consumida pelos animais

Todos os animais consumiram a água tanto quanto o controle, não havendo rejeição da mesma e, portanto, ausência de diferença significativa entre os grupos, conforme demonstrado na figura 4.



**Figura 4** - Quantidade de água consumida pelos animais ao longo do tratamento (15 semanas) expressa em mL por grama de peso. O erro padrão da média está representado pelas barras verticais. Controle-Biotério (n = 5), Governador Valadares (n = 5) e Colatina (n = 5).

Foi possível observar um decréscimo do consumo da água ao longo das semanas de tratamento. Os ratos *wistar* consomem água numa taxa inicial elevada, seguida de uma fase de manutenção lenta (AZAROV; WOODWARD, 2014), como observado no gráfico acima. Além disso, um rato adulto, pesando cerca de 300 g, consome em torno de 10 mL de água para cada 100 g de peso corpóreo (DOMINGOS CARVALHO *et al.*, 2009) ou 10 à 20 mL por dia (NEVES *et al.*, 2013) o que foi observado nas últimas semanas de tratamento, onde os animais possuíam cerca de 340 g de massa corporal consumindo, em torno de 13,60 mL de água para cada 100 g de peso corpóreo.

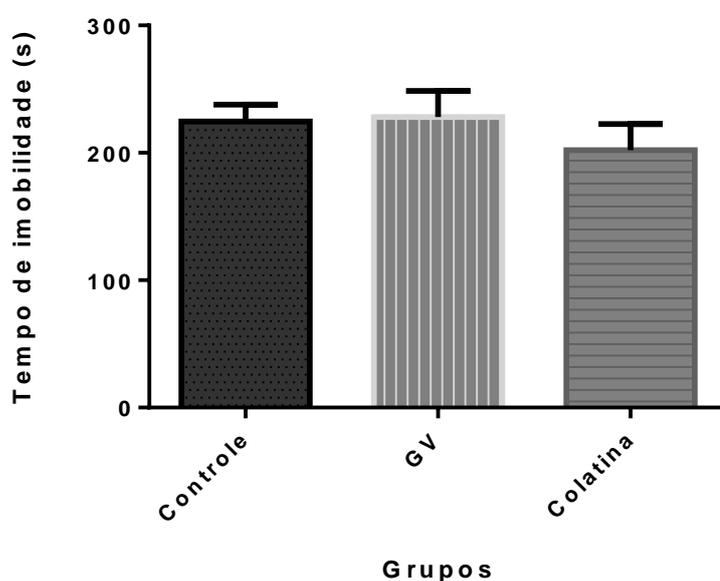
### 5.3 Modelo do nado forçado

No modelo do nado forçado foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de imobilidade, latência para imobilidade, tempo de escalada e frequência de bolos fecais.

### 5.3.1 Tempo de imobilidade

No teste do nado forçado, a imobilidade é considerada quando o animal, após um período de atividade exaustiva e vigorosa, adota um comportamento passivo caracterizado por ausência de movimentos ou apenas àqueles necessários para manter a cabeça acima da água, postura considerada como estado de “desespero comportamental” (CASTAGNÉ *et al.*, 2011). Desta forma o tempo de imobilidade reflete alguns aspectos de humor deprimido, uma vez que substâncias que induzem um potencial depressivo tendem a aumentar a duração deste parâmetro (KOKRAS, 2012; LIU *et al.*, 2007).

O presente estudo não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados para o tempo de imobilidade (Controle: média = 224,5; EPM= 13,26; GV: média = 228,2; EPM = 20,34; Colatina: média= 202; EPM = 20, 61), indicando ausência de efeito depressivo, conforme os dados demonstrados na figura 5.



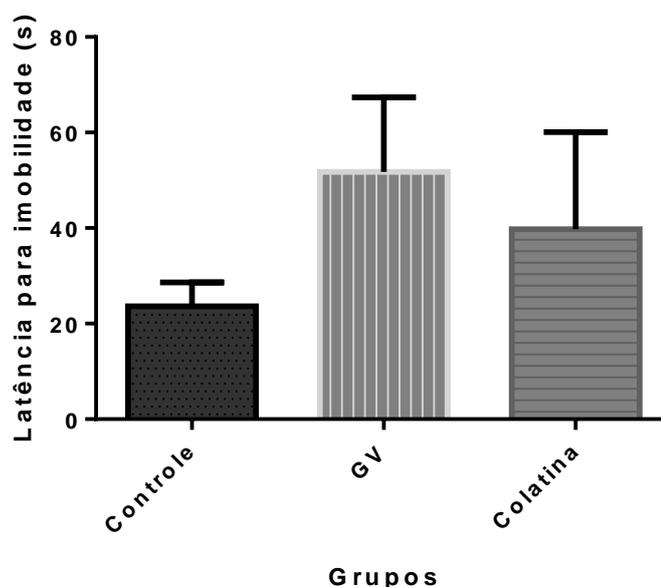
**Figura 5** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre o tempo de imobilidade (s) em animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

Esta ausência de diferença significativa para o tempo de imobilidade pode ser devido à concentração relativamente baixa de metais presentes na água de

abastecimento, já que estudos mostraram que ratos expostos à água potável, de forma isolada, com concentrações de Mn, (0,4 g/L) durante 6 semanas (KRISHNA *et al.*, 2014) e cloreto de Al (50 mg/kg/dia) por 3 meses (REBAI; DJEBLI, 2008), exibiam um tempo de imobilidade significativamente aumentado, demonstrando efeito depressivo. Apesar da exposição subcrônica dos estudos supracitados, os mesmos utilizaram concentrações mais elevadas de metais quando comparadas às concentrações obtidas na água de abastecimento deste trabalho, justificando assim a ausência de efeito depressivo encontrado.

### 5.3.2 Latência para imobilidade

A latência para imobilidade (tempo gasto pelo animal para cessar o movimento) é um parâmetro adicional utilizado para quantificar o estado de “desespero comportamental” do animal, sendo medida a partir do momento em que este é imerso no cilindro com água (CHEN *et al.*, 2015). O presente estudo não obteve diferença significativa entre os grupos avaliados no parâmetro latência para imobilidade (Controle: média = 23,6; EPM = 5,046; GV: média = 51,8; EPM = 15,69; Colatina: média = 39,8; EPM = 20,28), conforme apresentado na figura 6.



**Figura 6** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a latência para imobilidade (s) em animais submetidos ao nado forçado. As

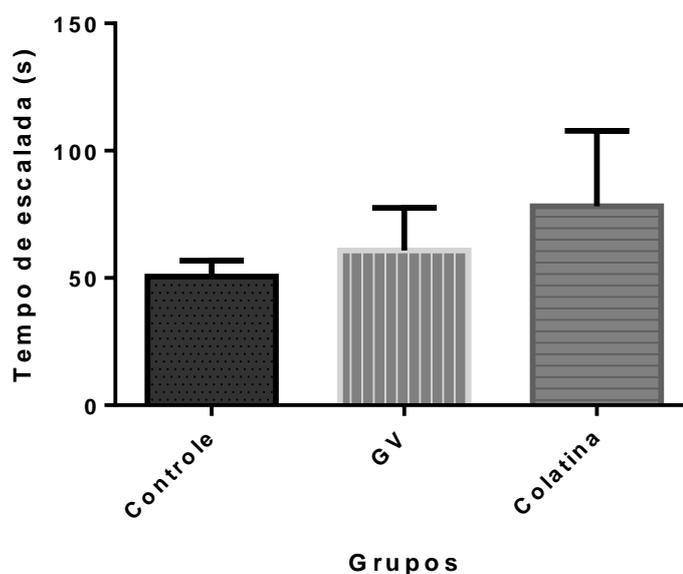
colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

A latência para imobilidade é uma variável que melhora a sensibilidade no teste do nado forçado aos antidepressivos tricíclicos e aos inibidores da recaptação da serotonina e noradrenalina (IRSN) (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009), usualmente utilizados como controles positivos, de modo que estes aumentam a latência para imobilidade, fazendo com que os animais permaneçam mais tempo exercendo comportamentos ativos de mobilidade. Com isso, substâncias que induzem um potencial depressivo tendem a diminuir a latência para imobilidade, favorecendo o comportamento passivo de imobilidade, indicando que o animal está mais propenso à um comportamento depressivo (ALLEN *et al.*, 2010).

Sabe-se que a latência para imobilidade é um parâmetro preditivo do efeito antidepressivo, uma vez que possui alta sensibilidade na detecção de tais efeitos (PLIAKAS *et al.*, 2001). Sendo assim, a ausência de diferença significativa entre os grupos analisados, para este parâmetro, pode ser explicada devido ao fato de não ter sido utilizado um antidepressivo como controle positivo, não havendo, portanto, uma ação antidepressiva.

### 5.3.3 Tempo de escalada

O tempo de escalada faz parte do comportamento ativo do animal no qual o mesmo executa movimentos verticais vigorosos com as patas dianteiras acima da superfície da água ou sendo dirigidas contra as paredes do cilindro (FERNANDES *et al.*, 2012; QUEVEDO, 2009). Deste modo, substâncias que induzem um potencial depressivo tendem a diminuir o tempo deste comportamento ativo (KOKRAS *et al.*, 2012). No entanto, não foi observado diferença significativa entre os grupos avaliados para este parâmetro (Controle: média = 50,6; EPM = 6,234; GV: média = 60,8; EPM = 16,84; Colatina: média = 78,2; EPM = 13,26) demonstrando ausência de efeito depressivo, conforme pode ser observado na figura 7.

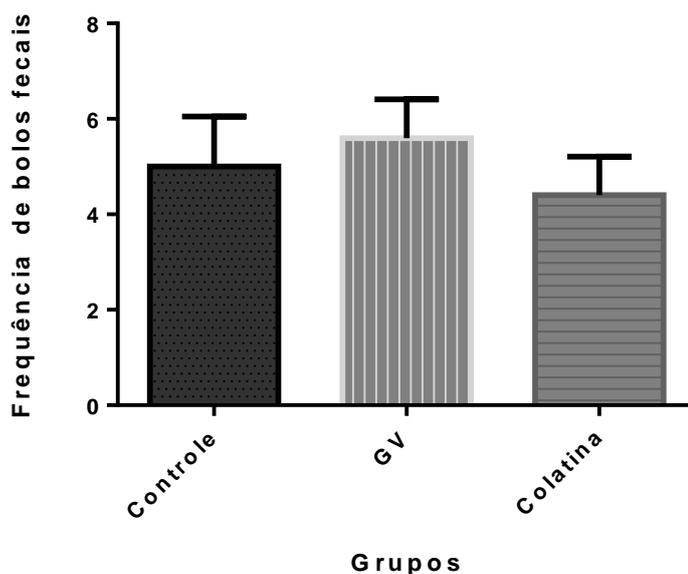


**Figura 7** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre o tempo de escalada (s) em animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

#### 5.3.4 Frequência de bolos fecais

O número de bolos fecais excretados durante o teste do nado forçado tem uma relação com a medida de emocionalidade, sendo que o aumento deste parâmetro é um indicativo do comportamento do tipo depressivo (ZANOS, 2014; CRAFT, 2010).

O presente estudo não obteve diferença significativa entre os grupos avaliados quanto à frequência de bolos fecais (Controle: média = 5; EPM = 1,049; GV: média = 5,6; EPM = 0,8124; Colatina média = 4,4; EPM = 0,8124), conforme os dados demonstrados na figura 8.



**Figura 8** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de bolos fecais em animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

Pode-se perceber na tabela 2 que os metais Cu (208,20µg/L), Mn (41,31 µg/L), Pb (14,45 µg/L) e Ba (143,80 µg/L) apresentaram concentrações relativamente elevadas nos grupos Controle (quanto ao Cu), Governador Valadares (quanto ao Mn e Pb) e Colatina (quanto ao Ba), estando o ferro elevado em todos os grupos e, de modo geral, os grupos possuem médias semelhantes em relação à frequência de bolos fecais. Isto pode ser justificado pelo fato de boa parte destes metais serem, preferencialmente, excretados pela via hepatobiliar através das fezes (PEDROSA; COZZOLINO, 1999; BIMBATO; CARVALHO; REIS, 2015; MOREIRA; MOREIRA, 2004; RAMANATHAN, 2007), sendo que o ferro não absorvido também é excretado através desta via (ROSA *et al.*, 2009). Além disso, o estresse induzido pelo nado forçado acelera o trânsito colônico dos animais (CEREMUGA, 2015) o que contribui para obtenção das médias semelhantes em relação à frequência de bolos fecais e, por consequência, a ausência de diferença significativa entre os grupos.

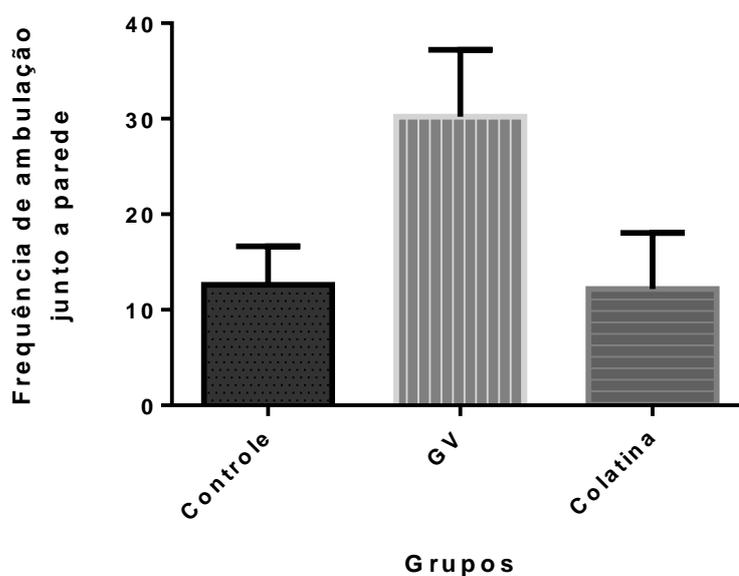
## 5.4 Modelo do campo aberto

No modelo do campo aberto foram avaliados os seguintes parâmetros: ambulação junto à parede, ambulação junto ao centro, frequência de cruzamentos, frequência de levantamento, frequência de autolimpeza e frequência de bolos fecais.

### 5.4.1 Ambulação junto à parede

A atividade do animal na área periférica do campo aberto, postura denominada de tigmotaxia, está associada à um aumento do nível de ansiedade, de modo que o mesmo tende a ambular em contato com a parede do aparelho onde se encontram mais protegidos (CUTLER *et al.*, 2010; HOLSBOER; STRÖHLE, 2005; SHAW, 2007). A tigmotaxia é um comportamento adotado pelo animal para evitar a área aberta desconhecida e, portanto, potencialmente perigosa (CHOLERIS *et al.*, 2001). Os animais tendem a progredir paralelamente às paredes adjacentes presentes na área periférica, de modo a tentar fugir do ambiente novo (SHAW, 2007), orientando sua progressão e aumentando sua velocidade de locomoção (LAMPREA *et al.*, 2008).

O presente estudo não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados para a ambulação junto à parede (Controle: média = 12,6; EPM = 4,057; GV: média = 30,2; EPM = 7,017; Colatina: média = 12,2; EPM = 5,851) indicando ausência de efeito ansiogênico, conforme os dados demonstrados na figura 9.



**Figura 9** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a ambulância junto à parede em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

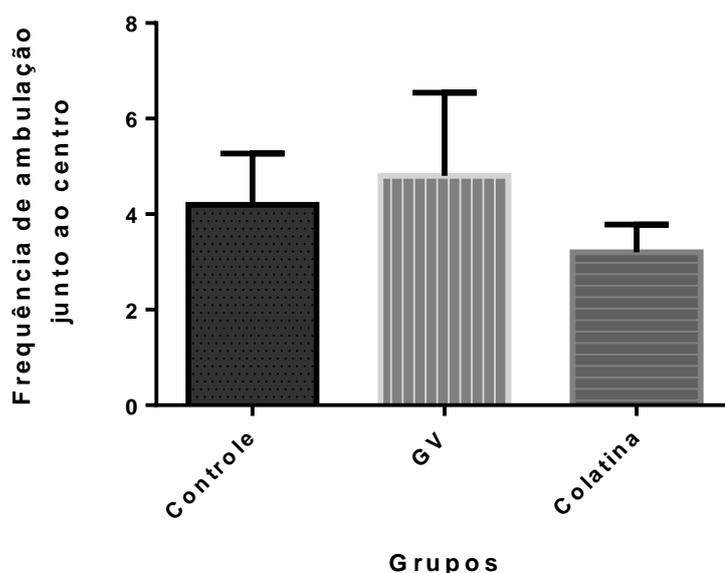
Pode-se perceber que, apesar da ausência de diferença significativa, o grupo de Governador Valadares apresentou uma maior média para este parâmetro, quando comparado aos outros grupos. Estudo com ratos tratados com cloreto de alumínio (250 mg/kg de  $AlCl_3$ ) na água potável durante 6 semanas, demonstrou que os mesmos permaneceram mais tempo na área periférica no teste do campo aberto (FARHAT; MAHBOOB, 2017). Estudo realizado por Chang e colaboradores (2015) demonstrou que após 4 semanas de exposição subcrônica ao arsênio (10 mg/L) na água potável, ratos apresentaram um maior tempo gasto na região periférica do campo aberto, indicando comportamentos semelhantes à ansiedade.

Cabe salientar que, apesar da maior concentração de metais nos estudos supracitados, os mesmos possuíam um tempo de exposição menor que o utilizado neste estudo, demonstrando que a dose e período de exposição podem contribuir para alterações comportamentais no campo aberto, mais especificamente para ambulância junto à parede.

#### 5.4.2 Ambulação junto ao centro

Os animais possuem uma tendência a evitar áreas abertas, de modo que o aumento da atividade de ratos na área central do campo aberto está intimamente relacionada à uma redução da ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Enquanto isso, uma menor distância percorrida somada a uma redução do tempo gasto na área central é um indicativo de comportamento ansioso (LIEBSCH *et al.*, 1998).

O presente estudo não obteve diferença significativa entre os grupos avaliados para a ambulação junto ao centro (Controle: média = 4,2; EPM = 1,068; GV: média = 4,8; EPM = 1,744; Colatina: média= 3,2; EPM = 0,583), indicando ausência de efeito ansiolítico, conforme os dados demonstrados na figura 10.



**Figura 10** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a ambulação junto ao centro em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

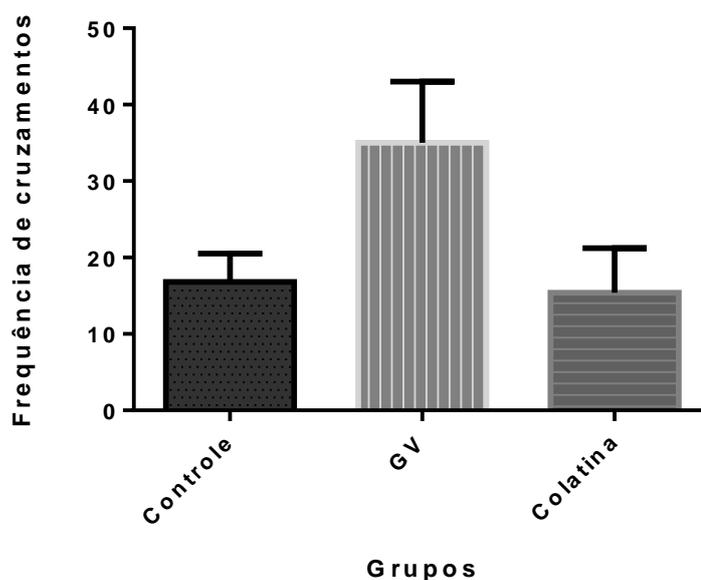
A ausência de diferença significativa para a ambulação junto ao centro, poderia ser explicada devido ao fato dos animais possuírem uma tendência a evitar a área central do campo aberto uma vez que, ao ser composta por quadrantes sem paredes adjacentes, esta induziria maior ansiedade nos animais (LAMPREA *et al.*, 2008). Sendo assim, uma maior permanência nessa área central estaria relacionada à uma

atividade ansiolítica, algo que não foi evidenciado neste estudo indicando uma ausência de tal efeito após exposição da água de abastecimento.

#### 5.4.3 Frequência de cruzamentos

A frequência de cruzamentos corresponde à atividade locomotora do animal, onde esta é considerada um indicador de resposta emocional a um ambiente desconhecido, de modo que uma redução da atividade correlaciona-se a um aumento da ansiedade (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDES, 2012; KRISHNA *et al.*, 2014).

O presente estudo não obteve diferença significativa entre os grupos avaliados para a frequência de cruzamentos (Controle: média = 16,8; EPM = 3,720; GV: média = 35; EPM = 8,031; Colatina: média = 15,4; EPM = 5,845), conforme demonstrado na figura 11.



**Figura 11** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre frequência de cruzamentos em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

Estudos envolvendo a exposição prolongada a baixos níveis de Mn (120 mg /L durante 90 dias), Pb (30 ppm e 230 ppm por 28 dias) nitrato de chumbo (20 mg/L durante 90 dias) e nitrato de alumínio (80 mg/L durante 90 dias) diluídos em água

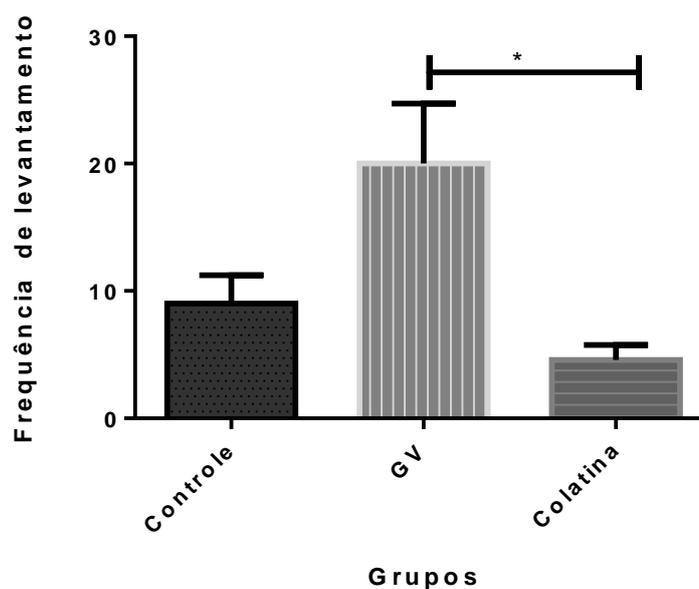
potável não apresentaram alterações significativas em relação à frequência de cruzamentos, o que foi encontrado no presente estudo (TERNES *et al.*, 2014; FLORES-MONTOYA; SOBIN, 2015; AZZAOU; AHAMI, 2009; KHADMAOUI, 2008).

No entanto, estudo com ratos expostos durante 3 meses ao acetato de chumbo 0,5% diluído em água potável demonstraram baixa atividade locomotora no teste do campo aberto, enquanto que a exposição a uma concentração menor (0,2%) não alterou a atividade locomotora (SANSAR; GAMRANI *et al.*, 2011). Desta forma, sugere-se que a exposição a doses relativamente baixas de metais, em especial o chumbo, podem não ser capazes de alterar o desempenho locomotor de ratos.

#### 5.4.4 Frequência de levantamento

O levantamento, que corresponde quando o animal eleva as patas dianteiras apoiando-se sob suas patas posteriores, é uma medida que faz parte do comportamento exploratório do animal, de modo que após se familiarizarem com o ambiente tem-se uma redução deste comportamento (FARHAT; MAHBOOB; AHMED, 2017).

O presente estudo obteve diferença estatisticamente significativa do grupo Governador Valadares quando comparado ao grupo Colatina ( $p = 0,011$ ), bem como uma forte tendência em relação ao grupo controle ( $p = 0,06$ ), conforme demonstrado na figura 12 (Controle: média = 9; EPM = 2,236; GV: média = 20; EPM = 4,701; Colatina: média = 4,6; EPM = 1,166).



**Figura 12** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência levantamentos em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

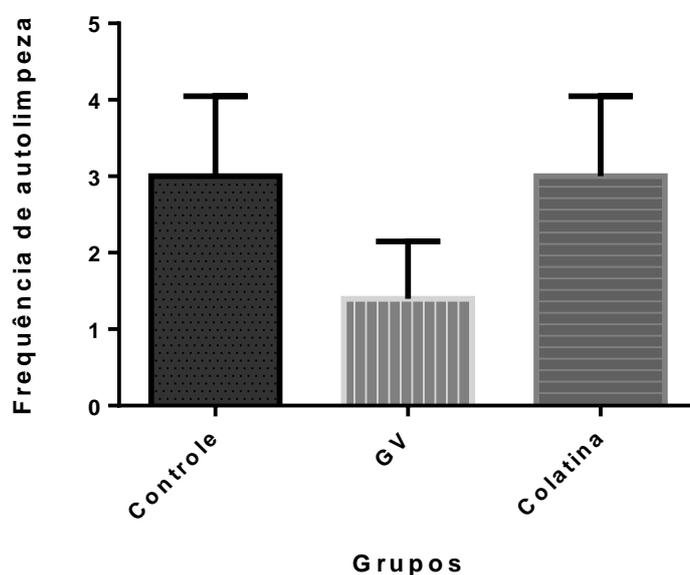
Vale ressaltar que o grupo de Governador Valadares (GV) permaneceu mais tempo na área periférica do aparelho quando comparado aos outros grupos (mesmo com ausência de diferença significativa). Como a área periférica possui paredes adjacentes, esta poderia oferecer mais estímulos para o comportamento exploratório do animal através do levantamento (LAMPREA *et al.*, 2008). Ademais, a água de tratamento exposta ao grupo de Governador Valadares possuía uma maior concentração de chumbo. Estudo realizado por Aechtvs e colaboradores (1991) demonstraram alteração na frequência de levantamento no campo aberto, após exposição ao acetato de chumbo 2 % diluído na água potável durante 30 dias. Uma vez colocado no campo aberto o animal tende a “congelar” (comportamento dedicado à avaliação de risco do local) e após algum tempo pode ser substituído por comportamentos exploratórios, como o levantamento e locomoção (DÍAZ-MORÁN *et al.*, 2014), algo que foi evidenciado no estudo supracitado. Desta forma, o aumento da frequência de levantamento observada no grupo de Governador Valadares poderia

estar relacionada à tendência do animal em explorar o ambiente novo, uma vez que estes permaneceram mais tempo na área periférica do campo aberto, sendo considerado um comportamento comum do mesmo, sem relação com atividade ansiolítica ou ansiogênica.

#### 5.4.5 Frequência de autolimpeza

A autolimpeza é um comportamento normal e importante que faz parte de todos os animais, sendo um índice de adaptação comportamental auxiliando na redução do estresse (FARHAT; MAHBOOB; AHMED, 2017; SHAW et al., 2007).

O presente estudo não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados para a frequência de autolimpeza (Controle: média = 3; EPM = 1,149; GV: média = 1,4; EPM = 0,748; Colatina: média = 3; EPM = 1,049), conforme demonstrado na figura 13.



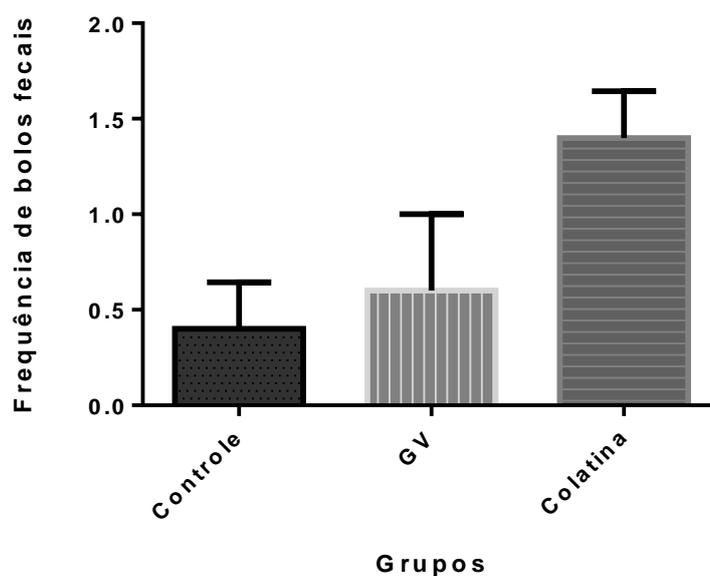
**Figura 13** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de autolimpeza em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

Quando o animal é exposto a uma situação que induz medo ou ansiedade o comportamento de autolimpeza geralmente aumenta (SHAW *et al.*, 2007), com o intuito de reduzir a excitação após a situação estressante, contribuindo para manutenção da homeostase (PEREIRA *et al.*, 2009). Além disso, quando este não é executado seguindo o padrão cefalocaudal tem-se um aumento da ansiedade (FARHAT; MAHBOOB; AHMED, 2017). Cabe salientar que todos os grupos apresentaram um padrão cefalocaudal de autolimpeza, porém o tratamento com água de abastecimento não alterou, de forma significativa, este comportamento em relação ao controle. Desta forma, pode-se inferir que o tratamento com água de abastecimento não induziu uma atividade ansiogênica nos animais tratados.

#### 5.4.6 Frequência de bolos fecais

No teste do campo aberto a defecação é um dos indicadores mais bem estabelecidos de comportamento emocional (SHAW *et al.*, 2007). A resposta ao medo do animal exposto ao ambiente novo é acompanhada por alto nível de defecação, bem como por baixa ambulação, especialmente na zona central, sendo, portanto, indicativo de ansiedade (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDES, 2012; SESTAKOVA *et al.*, 2013).

O presente estudo não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados para a frequência de bolos fecais (Controle: média = 0,4; EPM = 0,244; GV: média = 0,6; EPM = 0,400; Colatina: média = 1,4; EPM = 0,244), conforme os dados demonstrados na figura 14.



**Figura 14** - Efeito da ingestão crônica de água de abastecimento e água do controle sobre a frequência de bolos fecais em animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão da média. Controle - Biotério (n = 5), GV= Governador Valadares (n = 5), Colatina (n = 5).

Apesar do grupo de Colatina apresentar uma maior média de frequência de bolos fecais em relação aos outros grupos, esta não estava alterada de forma significativa quando comparada ao controle, indicando que a água de tratamento não induziu um efeito ansiogênico nos animais expostos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados dos parâmetros do teste do nado forçado e campo aberto sugere que não houve alterações comportamentais relacionadas à depressão e ansiedade, respectivamente, em relação ao controle, após ingestão crônica com água de abastecimento. Além disso, ao longo do tratamento não houve alteração no consumo de água pelos animais, sendo que os mesmos mantiveram um ganho de massa corporal constante.

Vale ressaltar que as alterações comportamentais poderiam ser investigadas mais profundamente utilizando outros modelos comportamentais, tais como o labirinto em cruz elevado (para medir a capacidade ansiogênica) bem como o teste de suspensão da cauda (para medir a capacidade depressiva), incluindo antidepressivos como controle positivo, a fim de validar os métodos, e aumentar o número de animais por grupo de modo a observar uma resposta estatística mais clara.

A ausência de alterações comportamentais poderia estar relacionada a concentrações limítrofes de alguns metais na água de abastecimento utilizada neste estudo, levando em consideração que apenas os elementos ferro e chumbo estão elevados, no grupo de Colatina (em relação ao ferro) e Governador Valadares (em relação ao ferro e chumbo), segundo os parâmetros estabelecidos na Portaria 2.914/2011.

Cabe salientar que, apesar de não ter induzido alterações no comportamento dos animais, isto não descarta a presença de toxicidade, tendo em vista que estes metais podem causar efeitos tóxicos relevantes, mesmo quando ingeridos em baixas concentrações, devido à sua capacidade de biomagnificação ao longo das cadeias tróficas. Desta forma, deve-se considerar a avaliação do efeito da exposição aos alimentos irrigados com esta água ou até mesmo os peixes que entram em contato com a mesma, uma vez que estes podem ser utilizados como um organismo indicador da qualidade ambiental quanto a biodisponibilidade de metais e seu potencial de toxicidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLI, Djallal Eddine Houari et al. The Efficacy of Syzygium aromaticum Essential Oil in Cognitive Disorders against Manganese Chronic Exposure in Rats during Development. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, n. 2, 2014

AECHTVSS, E. Effects of lead on the behavioral complex stereotypes and regional brain dopamine levels in rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 20, p. 527-530, 1991.

ALBERT, P. R.; BENKELFAT, C.; DESCARRIES, L. The neurobiology of depression-revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2378-2381, 2012.

ALLEN, Patricia J. et al. Chronic creatine supplementation alters depression-like behavior in rodents in a sex-dependent manner. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 534, 2010.

ALTMANN, P. et al. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. **BMJ : British Medical Journal**, v. 319, n. 7213, p. 807-811, 1999.

ANA, Agência Nacional de Águas. Encarte sobre a Bacia do Rio Doce- Rompimento da Barragem em Mariana MG. Disponível em: [http://arquivos.ana.gov.br/RioDoce/EncarteRioDoce\\_22\\_03\\_2016v2.pdf](http://arquivos.ana.gov.br/RioDoce/EncarteRioDoce_22_03_2016v2.pdf). Acesso em 17 fev. 2017

ANDERSSON, H. et al. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, n. 2, p. 105-115, 1997.

ASCHNER, Michael. Manganese: brain transport and emerging research needs. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. Suppl 3, p. 429, 2000.

ATSR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological profile for manganese (update) Atlanta, GA. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. 2000.

AUSIELLO, D.; GOLDMAN, L. Tratado de Medicina Interna: clínica médica. 23.ed. **Elsevier**, 2009.

AZAROV, Alexey V.; WOODWARD, Donald J. Early ethanol and water consumption: Accumulating experience differentially regulates drinking pattern and bout parameters in male alcohol preferring (P) vs. Wistar and Sprague Dawley rats. **Physiology & behavior**, v. 123, p. 20-32, 2014.

AZZAOUI, F. Z.; AHAMI, A. O.; KHADMAOUI, A. Impact of aluminum sub-chronic toxicity on body weight and recognition memory of wistar rat. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 11, n. 14, p. 1830-1834, 2008.

AZZAOUI, F. Z.; AHAMI, A. O.; KHADMAOUI, A. Impact of lead sub-chronic toxicity on recognition memory and motor activity of Wistar rat. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 12, n. 2, p. 173-177, 2009.

BEARD, John L.; CONNOR, James R. Iron status and neural functioning. **Annual review of nutrition**, v. 23, n. 1, p. 41-58, 2003.

BIMBATO, Eric Mendonça; CARVALHO, Amanda Gontijo; REIS, Fabiano. Encefalopatias tóxicas e metabólicas: ensaio iconográfico. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 121-125, 2015.

BONDY, Stephen C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 575-581, 2010.

BOUABID, Safa et al. Manganese-induced atypical parkinsonism is associated with altered basal ganglia activity and changes in tissue levels of monoamines in the rat. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98952, 2014.

BOUCHARD, Maryse F. et al. Blood lead levels and major depressive disorder, panic disorder, and generalized anxiety disorder in US young adults. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1313-1319, 2009.

BOUCHARD, Maryse F. et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 1, p. 138, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12/2011. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

CASTAGNÉ, Vincent et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**, v. 55, n. 8.10, p. 1-8.10, 2011.

CASTAGNÉ, Vincent; PORSOLT, Roger D.; MOSER, Paul. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European journal of pharmacology**, v. 616, n. 1, p. 128-133, 2009.

CECIL, Kim M. et al. Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure. **PLoS Med**, v. 5, n. 5, p. e112, 2008.

CEREMUGA, Tomás Eduardo et al. Evaluation of the anxiolytic and antidepressant effects of asiatic acid, a compound from Gotu kola or Centella asiatica, in the male Sprague Dawley rat. **AANA J**, v. 83, n. 2, p. 91-8, 2015.

CHANG, Chia-Yu et al. Subchronic arsenic exposure induces anxiety-like behaviors in normal mice and enhances depression-like behaviors in the chemically induced mouse model of depression. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

CHEN, L. et al. Novel insights into the behavioral analysis of mice subjected to the forced-swim test. **Translational psychiatry**, v. 5, n. 4, p. e551, 2015.

CHEN, Pan; CULBRETH, Megan; ASCHNER, Michael. Exposure, epidemiology, and mechanism of the environmental toxicant manganese. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 13802-13810, 2016.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed

magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.

CORTECCI G. GEOLOGIA E SAÚDE. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/geosaude.pdf>. Acesso em 25 abril. 2017

CRAFT, R. M. et al. Forced swim test behavior in postpartum rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 4, p. 402-412, 2010.

CRUZ, A. P. M., e LANDEIRA-FERNANDES, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Métodos em Neurociência. São Paulo: Manole, 192 – 217, 2012.

CUTLER, Neal R. et al. **Critical pathways to success in CNS drug development**. John Wiley & Sons, 2010.

DE FALCO, D. S. CUKIERMAN, R. A. HAUSER-DAVIS, and N. A. Rey, “Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento.” **Química Nova**, vol. 39, n. 1, pp. 63–80, 2016.

DÍAZ-MORÁN, Sira et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: focus on freezing and grooming. **World Journal of Neuroscience**, v. 2014, 2014.

DO AMARAL, José Eduardo; KREBS, Antonio Silvio J. Drenagem ácida da mineração de carvão e sua interrelação com metais pesados e recarga de aquíferos na Bacia Carbonífera do Estado de Santa Catarina. **Águas Subterrâneas**, 2010.

DOMINGOS CARVALHO, Gabriel et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, 2009.

DUARTE, Anderson Pires. Classificação das barragens de contenção de rejeitos de mineração e de resíduos industriais no estado de Minas Gerais em relação ao potencial de risco. **Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Belo Horizonte**, 2008.

ERIKSON, Keith M. et al. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 369-377, 2007.

FARHAT, Syeda Mehpara; MAHBOOB, Aamra; AHMED, Touqeer. Cortex-and Amygdala-Dependent Learning and Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Expression is Severely Impaired in Mice Orally Treated with AlCl<sub>3</sub>. **Biological trace element research**, p. 1-11, 2017.

FERNANDES, Eduardo Vignoto et al. Efeitos comportamentais e imunológicos da fluoxetina em ratos submetidos ao nado forçado. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 28, n. 4, p. 409-415, 2012.

FERREIRA, Aldo Pacheco; WERMELINGER, Eduardo Dias. Concentrações séricas de metais e suas implicações para a saúde pública. **J. Health Sci. Inst**, v. 31, n. 1, 2013.

FERREIRA, Pricilla Costa et al. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, n. 1, p. 151-157, 2008.

FLORES-MONTOYA, Mayra Gisel; SOBIN, Christina. Early chronic lead exposure reduces exploratory activity in young C57BL/6J mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 759-765, 2015.

FREITAS, V. P. S.; BRIGIDO, B. M.; BADOLATO, M. I. C.; ALABURDA, J. Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região de campinas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 51-58, 2002.

FUNCHAL, Cláudia da Silva; DANI, Caroline. Neurociências: modelos experimentais em animais. 1ª Ed. Porto Alegre, **EdiPUCRS**, 2014.

GIAIA. RELATÓRIO-TÉCNICO DETERMINAÇÃO DE METAIS NA BACIA DO RIO DOCE (PERÍODO: DEZEMBRO-2015 A ABRIL-2016). Disponível em: [http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA\\_Metais\\_Vivian\\_revisto5.pdf](http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf). Acesso em 21 fev. 2017

GONG, Gordon et al. Low-level groundwater arsenic exposure impacts cognition: a project FRONTIER study. **Journal of environmental health**, v. 74, n. 2, p. 16, 2011.

GROTTO, Helena ZW et al. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2008.

HAIDER, Saida et al. Alteration in plasma corticosterone levels following long term oral administration of lead produces depression like symptoms in rats. **Metabolic brain disease**, v. 28, n. 1, p. 85-92, 2013.

HAIDER, Saida et al. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 1, p. 83-92, 2015.

HAMADANI, J. D. et al. Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of cognitive function in pre-school girls and boys: a population-based cohort study. **International journal of epidemiology**, v. 40, n. 6, p. 1593-1604, 2011.

HOLSBOER, Florian; STRÖHLE, Andreas (Ed.). **Anxiety and anxiolytic drugs**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

IBAMA. LAUDO TÉCNICO PRELIMINAR. Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana. Disponível em:

[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo\\_tecnico\\_preliminar\\_ibama.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf). Acesso em 17 fev. 2017

IBRAM. (2015). Informações sobre a economia mineral brasileira 2015. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005836.pdf>. Acesso em 11 fev. 2017

IBRAM. (2016). Panorama da mineração em minas gerais 2016. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00006212.pdf>. Acesso em 11 fev. 2017

JÉQUIER, E.; CONSTANT, F. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 115-123, 2010.

JÉQUIER, Eric; CONSTANT, Florence. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, n. 2, p. 115-123, 2010.

JONES, Douglas C.; MILLER, Gary W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 569-581, 2008.

KAWAHARA, Masahiro; KATO-NEGISHI, Midori. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

KIM, Jonghan; WESSLING-RESNICK, Marianne. Iron and mechanisms of emotional behavior. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1101-1107, 2014.

KIM, Minjeong et al. Arsenic exposure in drinking water alters the dopamine system in the brains of C57BL/6 mice. **Biological trace element research**, v. 162, n. 1-3, p. 175-180, 2014

KIM, Yangho; PARK, Sangkyu. Iron deficiency increases blood concentrations of neurotoxic metals in children. **Korean journal of pediatrics**, v. 57, n. 8, p. 345-350, 2014.

KLAASSEN, Curtis D.; WATKINS III, John B. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange). 2º Ed. Porto Alegre, **AMGH**, 2012.

KOKRAS, Nikolaos et al. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 436-445, 2012.

KRISHNA, Saritha et al. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 1, p. 47-64, 2014.

LAFUENTE, A. et al. Effect of cadmium on 24-h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats. **Experimental brain research**, v. 149, n. 2, p. 200-206, 2003.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 135-140, 2008.

LANA, Zilda Maria De Oliveira. A Atividade Mineradora em Minas Gerais e em Ouro Preto: Impactos Socioambientais e Intervenções para a Sustentabilidade. **Sociedade e Território – Natal**. Vol. 27, n.3, p. 45 – 59, 2015

LAO, Yi et al. Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. **Scientific Reports**, v. 7, 2017

LIEBSCH, Gudrun et al. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioural brain research**, v. 94, n. 2, p. 301-310, 1998

LIU, Guo-Xiang et al. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1531-1539, 2007.

LOZOFF, Betsy et al. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. **Pediatrics**, v. 105, n. 4, p. e51-e51, 2000.

MAAROUFI, Karima et al. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 2, p. 343-349, 2009.

MOREIRA, Fátima Ramos; MOREIRA, Josino Costa. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167-181, 2004.

NEVES, Silvânia MP. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

O'NEAL, Stefanie L. et al. Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity. **Neurotoxicology**, v. 44, p. 303-313, 2014.

OGA, S., CAMARGO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. 4º Ed. São Paulo, **Atheneu**, 2014.

OULHOTE, Youssef et al. Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. **Environmental Health Perspective**, v. 122, p. 9. 2014.

Passagli, Marcos et al. Toxicologia Forense, 2ª ed. Campinas, **Millennium** 2009.

PEDROSA, Lucia de Fátima Campos; COZZOLINO, Sílvia Maria Franciscato. Metabolic and functional alterations of copper in diabetes mellitus. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 3, p. 213-224, 1999.

PEREIRA, Charlane Kelly Souto et al. Estudo da ação psicofarmacológica de *Herissantia crispera* (L.) Brizicky (Malvaceae). 2009.

PERES, Tanara V. et al. Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 57, 2016.

PETRUSEVSKI, Branislav et al. Arsenic in drinking water. **Delft: IRC International Water and Sanitation Centre**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2007.

PLIAKAS, Andrea M. et al. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7397-7403, 2001.

PÔRTO, Weyler Galvão. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia?. **Rev. Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 70-76, 2001.

PRAKASH, Chandra; SONI, Manisha; KUMAR, Vijay. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 179-188, 2016.

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, 2013.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 3-33, 2003.

QUEVEDO, João; DA SILVA, Antônio Geraldo. **Depressão: teoria e clínica**. Artmed Editora, 2009.

RAMANATHAN, Raghupathy. Barium and barium salts. **Spacecraft Water Exposure Guidelines for Selected Contaminants**, v. 2, p. 52, 2007.

REBAI, Ouafa; DJEBLI, Nour Eddine. Chronic exposure to aluminum chloride in mice: exploratory behaviors and spatial learning. **Adv Biol Res**, v. 2, n. 1-2, p. 26-33, 2008.

ROBSON, Mark. Methodologies for assessing exposures to metals: human host factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 104-109, 2003.

RONDEAU, Virginie et al. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. **American journal of epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 489-496, 2009.

ROSA, P. S. et al. The effect of iron supplementation in the diet of *Dasyus novemcinctus* (Linnaeus, 1758) armadillos in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, p. 117-122, 2009.

ROSALINO, Melanie Roselyne Rodrigues. **Potenciais efeitos da presença de alumínio na água de consumo humano**. 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

SALVADOR, Gabriela A.; URANGA, Romina M.; GIUSTO, Norma M. Iron and mechanisms of neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2010.

SANSAR, Wafa; AHBOUCHA, Samir; GAMRANI, Halima. Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. **Acta histochemica**, v. 113, n. 6, p. 601-607, 2011.

SESTAKOVA, Natalia et al. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 3, p. 126-135, 2013.

SHARMA, Bechan; SINGH, Shweta; SIDDIQI, Nikhat J. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SHAW, David et al. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 613-620, 2007.

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

SILVA, Marcelo Campos Appel da et al. Manifestações gastrintestinais e diagnóstico de intoxicação por chumbo: relato de dois casos. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 1, p. 61-63, 2013.

SUÁREZ-FERNÁNDEZ, M. Belen et al. Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death. **Brain research**, v. 835, n. 2, p. 125-136, 1999.

TAVARES, Tania Mascarenhas; CARVALHO, Fernando Martins. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TCHOUNWOU, Paul B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. In: **Molecular, clinical and environmental toxicology**. Springer Basel, 2012. p. 133-164.

TERNES, A.P.L., et al. Long term exposure to low levels of Manganese Chloride improves the activity and expression of antioxidant enzymes in adrenal gland of adult rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 19-24, 2014.

TOMANARI, G. Y.; PINE, A. S.; SILVA, M. T. A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

WANG, San-Xiang et al. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. **Environmental health perspectives**, p. 643-647, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cadmium in drinking-water:** Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, p. 16 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Iron in Drinking-water:** Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, p. 9, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Lead in Drinking-water:** Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, p. 26, 2011.

YADAV, Rajesh S. et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 533-539, 2010.

YIN, Xin; GUVEN, Nuri; DIETIS, Nikolas. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing?. **Brain research**, v. 1652, p. 30-42, 2016.

ZANOS, Panos et al. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 4, p. 855-865, 2014.

ZHU, Wen-zhen et al. Quantitative MR Phase-corrected Imaging to Investigate Increased Brain Iron Deposition of Patients with Alzheimer Disease 1. **Radiology**, v. 253, n. 2, p. 497-504, 2009.

## 8 ANEXO 1



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da neurotoxicidade da água do Rio Doce após rompimento da barragem Fundão em ratos tratados cronicamente**”, registrada com o nº **003/16**, sob a responsabilidade de Vívian da Silva Santos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 20 / 09 / 2016.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	12 de dezembro de 2017.
<b>Espécie / linhagem/ raça</b>	<i>Rattus Norvegicus/ Wistar</i>
<b>Nº de Animais</b>	25
<b>Peso / Idade</b>	60g / 21 Dias
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Origem</b>	Biotério do Laboratório de Processos Básicos em Psicologia (UCB)

Brasília, 20 de Setembro de 2016.

Prof.ª *Juliana Lott de Carvalho*  
 Coordenadora da Comissão de Ética  
 no Uso de Animais/UCB  
 Universidade Católica de Brasília