

**FLAVIA CARLA DOS SANTOS MARTINS**

**O PAPEL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA  
DISPONIBILIDADE DE METAIS E BENZO[A]PIRENO E  
INDUÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM PEIXES.**

Bolsista FAPESP

São José do Rio Preto, SP

2013

**FLAVIA CARLA DOS SANTOS MARTINS**

**O papel das substâncias húmicas na disponibilidade de metais e benzo[a]pireno  
e indução de metalotioneínas em peixes.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Cristina Bisinoti

Co-orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto

2013

Martins, Flavia Carla dos Santos

O papel das substâncias húmicas na disponibilidade de metais e benzo[a]pireno e indução de metalotioneínas em peixes / Flavia Carla dos Santos Martins - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

98 f. : il. ; 30 cm.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Bisinoti

Co-orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas.

1. Química ambiental 2. Metalotioneínas 3. Substâncias Húmicas Aquáticas 4. Metais 5. Benzo[a]pireno I. Bisinoti, Márcia Cristina. II. de Almeida, Eduardo Alves. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 54:574

**O papel das substâncias húmicas na disponibilidade de metais e benzo[a]pireno  
e indução de metalotioneínas em peixes.**

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Cristina Bisinoti  
Professora Doutora MS3.2  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro  
Professora Associada MS5  
Faculdade de Tecnologia - UNICAMP - Limeira

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
Professor Adjunto  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 10 de Junho de 2013.

*“Sejam agradáveis as  
palavras da minha boca e a  
meditação do meu coração  
perante a tua face, Senhor,  
Rocha minha e meu  
Libertador!”*

*Salmos, 19, 14*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Damaris e Antonio Carlos, ao meu irmão Marcelo e ao meu noivo Ezequias.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus, por ter atentado para mim e me dado todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui. Toda e qualquer palavra de agradecimento seria insuficiente.*

*Agradeço aos meus pais, Damaris e Antonio Carlos, pela dedicação, zelo e acima de tudo pela educação que me fizeram trilhar caminhos de respeito e sucesso.*

*Ao meu irmão Marcelo, por sua alegria, amizade e companheirismo em todos os momentos.*

*Ao meu noivo Ezequias, pela compreensão e apoio dado em todas as minhas escolhas, mas principalmente pelo grande amor e dedicação comigo.*

*Aos colegas do Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais Amanda, Ana Lúcia, Fernanda, Glaucia, Hortênsia, Isabela, Jéssica, João Paulo, Kamilla, Laís, Mariele, Renata e Vinícius pela aprazível convivência e grande auxílio que os tornam para mim inesquecíveis amigos.*

*Aos alunos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática Andreia, Bruno, Danilo, Isabela, Lílian, Lucilene e aos técnicos Luis e Cintia pelo auxílio nos experimentos e na utilização da infraestrutura do laboratório.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Gonçalves de Freitas por ceder os peixes utilizados nos experimentos.*

*Aos técnicos Carlos e Rose pelo auxílio na coleta dos peixes utilizados nos experimentos.*

*À aluna de iniciação científica Bruna Godoi pelo auxílio na quantificação de metais em tecido muscular dos peixes, na água dos aquários e na montagem dos experimentos.*

*À aluna de iniciação científica Nayrê Ohana pelo auxílio na quantificação de metalotioneínas e na montagem dos experimentos.*

*Ao aluno de iniciação científica Henrique Ferraz pelo auxílio na extração das substâncias húmicas aquáticas, decomposições de tecido muscular dos peixes e montagem dos experimentos.*

*Ao Prof. Dr. Carlos R. Ceron e ao Prof. Dr. Gustavo O. B. Rodriguez pelas sugestões dadas no exame de qualificação, as quais enriqueceram esse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela orientação, ajuda, conselhos e pela constante disposição no esclarecimento de dúvidas.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Cristina Bisinoti pela brilhante orientação, paciência e entendimento não só profissionalmente, mas também pessoalmente, tornando-se um exemplo a ser seguido.*

*À FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa concedida (processo 2010/13877-0).*

## RESUMO

As substâncias húmicas aquáticas possuem grande importância ambiental por terem a capacidade de complexar íons metálicos presentes no ambiente influenciando a disponibilidade dos mesmos, tornando-os geralmente menos tóxicos para a biota. As Metalotioneínas (MT) apresentam a característica de regular metais nos organismos aquáticos, sendo induzidas na presença de metais e outros compostos e, portanto utilizadas como biomarcador ambiental. O benzo[a]pireno é oriundo de fontes biogênicas, pirogênicas e petrogênicas e seu efeito na indução de MT em tilápias é desconhecido. Neste contexto, foi avaliada a indução de MT em peixes expostos a metais tóxicos individualmente e na mistura, na ausência e presença de substâncias húmicas aquáticas (SHA), bem como na presença de benzo[a]pireno. Neste trabalho foram feitas a otimização e padronização do método para quantificação de metalotioneínas em fígado e brânquias de peixes empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência (HPLC-FD). Também foi avaliada a influência do tempo de duração dos ensaios na indução de metalotioneínas em peixes expostos a metais de interesse ambiental durante 3, 7 e 14 dias. Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram alocadas em aquários individuais e submetidas à exposição a concentrações regulamentadas pela resolução Conama 357/2005 para rios Classe 2, Classe 3 e 5 vezes Classe 3 de Cádmio, Cobre, Chumbo, Ferro e Benzo[a]pireno isoladamente, bem como a mistura dos metais na presença e ausência de SHA. A concentração de metal “livre” foi acompanhada durante os experimentos de exposição empregando o Sistema de Ultrafiltração com Fluxo Tangencial. Em todas as amostras de água dos experimentos de exposição e no tecido muscular dos peixes utilizados foram realizadas a quantificação do estoque de metal total empregando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (GFAAS) ou por Chama (FAAS) e os parâmetros físico-químicos foram monitorados seguindo a recomendação de método oficial. Os resultados revelaram a ocorrência de bioacumulação de Cu, Cd e Pb no tecido muscular, não sendo observada diferenças para o Fe. Foi observado um aumento na indução das MT hepáticas para os peixes expostos aos metais ( $17 - 127 \mu\text{g MT g}^{-1}$  de fígado) e ao benzo[a]pireno ( $23 - 82 \mu\text{g MT g}^{-1}$  de fígado), em relação ao grupo mantido como controle ( $17 - 34 \mu\text{g MT g}^{-1}$  de fígado), para todos os tempos avaliados. Assim os resultados indicaram que o aumento da concentração de MT em fígado de tilápias expostas a Cd, Pb, Fe, Cu e Benzo[a]pireno sugerem a possibilidade do emprego de MT como biomarcador para avaliar a resposta biológica dessa espécie para poluição de ambientes aquáticos por esses compostos. Observou-se que um período de 7 dias de exposição é suficiente para avaliar a indução da proteína em estudos de biomarcador ambiental a metais em tilápias. As SHA influenciaram negativamente na bioacumulação de Pb, tornando o metal menos biodisponíveis, enquanto o tempo de exposição e concentração do metal no meio influenciaram positivamente a acumulação de Fe no tecido muscular dos peixes. Houve uma diminuição da indução das MT com o aumento da concentração das SHA no meio e a concentração de metal “livre” não complexado as SHA foi menor em relação à concentração de metal total ao fim dos experimentos, permitindo concluir que tais substâncias diminuem a biodisponibilidade de metais.

**Palavras chave:** Metalotioneínas, Substâncias Húmicas Aquáticas, Metais, Benzo[a]pireno.



## **ABSTRACT**

The aquatic humic substances have great environmental importance to have the ability to complex metal ions present in the environment influencing their availability, making them generally less toxic to biota. Metallothioneins (MT) have the characteristic of regular metals on aquatic organisms being induced in the presence of metals and other compounds and therefore used as a biomarker environment. Benzo[a]pyrene is formed by biogenic sources, pyrogenic and petrogenic and its effect on the induction of MT in tilapia is unknown. In this context, we evaluated the induction of MT in fish exposed to toxic metals (Fe, Cu, Cd and Pb) individually and all these metal combined in the absence and presence of humic substances (SHA), as well as in the presence of benzo[a]pyrene. In this work we made the optimization and standardization of the method for quantification of metallothionein in liver and gills of fish employing the technique of High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector (HPLC-FD). We also evaluated the influence of the duration of the tests in the induction of metallothionein in fishes exposed to metals of environmental interest for 3, 7 and 14 days. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were placed in individual aquaria and subjected to exposure to concentrations regulated by CONAMA 357/2005 Resolution for rivers Class 2, Class 3 and 3 fold the concentrations to Class 3 for Cadmium, Copper, Lead, Iron and Benzo[a]pyrene separately, and all these metals combined in the presence and absence of SHA. The concentration of free metal was monitored during the exposure experiments using a Tangential Flow Ultrafiltration System (TFUS). In all samples of water exposure experiments and in the muscle tissue of fishes were quantified total metal employing a Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer (GFAAS) or Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS) and physico-chemical parameters were monitored following the recommendation of the official method. The results revealed the occurrence of bioaccumulation of Cu, Cd and Pb in muscle tissue, with no differences observed for Fe. An increase in the induction of hepatic MT for fish exposed to metal (17-127 mg MT-1 liver g) and benzo[a]pyrene (23-82 mg MT-1 liver g) in relation to control group (17-34 mg MT-1 liver g) for all periods studied. Thus the results indicate that increasing the concentration of MT in the liver of tilapias exposed to Cd, Pb, Fe, Cu and benzo[a]pyrene confirmed the possibility of use of MT as a biomarker to assess the biological response of this specie to water pollution for these compounds. It was observed that a period of 7 days exposure was sufficient to evaluate the MT induction as biomarker in environmental studies in tilapia. The SHA influenced negatively in the bioaccumulation of Pb, making it less bioavailable, while the exposure time and metal concentration in the water influenced the accumulation of Fe in the muscle tissue of fish. There was a decrease in the MT induction with increasing concentration in the water and the SHA concentration of the free metal SHA was lower in relation to the total metal concentration at the end of the experiments, leading to the conclusion that these substances reduce the bioavailability of metals.

**Keywords:** Metallothionein, Aquatic Humic Substances, Metals, Benzo[a]pyrene.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
- B - Exposição ao benzo[a]pireno
- BaP - Benzo[a]pireno
- C - Aquário referente ao grupo controle, sem adição de contaminante
- DTT - Ditioneitol
- EDTA – Ácido etilenodiamidotetracético
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAAS - Espectrofotômetro de absorção atômica com atomização por chama
- FB - Fator de bioacumulação
- GFAAS - Espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite
- HPA - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- HPLC-FD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
- IARC - Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer
- IHSS - Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- M - Exposição à mistura dos metais
- MB - Exposição à mistura dos metais mais o benzo[a]pireno
- mBBr - Monobromobimano
- MT - Metalotioneínas
- OD - Oxigênio Dissolvido
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- SHA - Substâncias húmicas aquáticas
- SUFT - Sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial
- TFA - Ácido trifluoroacético
- TOC - Carbono orgânico total
- USEPA - Agencia de Proteção Ambiental Americana
- UV-Vis - Ultravioleta Vísivel

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da metalotioneína, contendo domínios $\alpha$ e $\beta$ capazes de se ligar a até 4 e 3 átomos de metais, respectivamente (Adaptado de KLASSEN et al., 1999). .....	28
<b>Figura 2.</b> Foto de uma tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). .....	32
<b>Figura 3.</b> Esquema de extração das SHA do Rio Preto, passando pela coleta, filtração, percolação nas colunas, eluição e finalmente obtenção das mesmas. ....	38
<b>Figura 4.</b> Foto dos experimentos de exposição de tilápias a metais. No detalhe observa-se que cada aquário continha uma tilápia. ....	40
<b>Figura 5.</b> Foto dos experimentos de exposição de tilápias a metais. No detalhe observa-se que cada aquário continha uma tilápia. ....	43
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática simplificada do modelo de bioacumulação de um composto absorvido através das brânquias, transportado pelo fluxo sanguíneo, armazenado em diversos tecidos e metabolizado pelo fígado (Adaptado de BARRON, 1990). ....	45
<b>Figura 7.</b> Concentrações de Fe e Pb no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas às concentrações referentes à Resolução Conama 357/05 para rios classe 2, classe 3 e uma concentração 5 vezes maior que a classe 3. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle. ....	59
<b>Figura 8.</b> Concentrações de Fe, Pb, Cd e Cu no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas durante 3, 7 e 14 dias. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle. ....	60
<b>Figura 9.</b> Concentrações de Fe, Pb, Cd e Cu no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas a esses metais na presença e ausência de SHA. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle. ....	62
<b>Figura 10.</b> Separação de MT de fígado de tilápia por HPLC-FD usando 20, 10 e 12 $\mu\text{L}$ (A) e 10, 4 e 7 $\mu\text{L}$ (B) de DTT, SDS e mBBBr, respectivamente. As setas indicam o pico referente à MT. ....	64
<b>Figura 11.</b> Curva analítica típica utilizada na quantificação de metalotioneínas. No detalhe, cromatogramas gerados a partir das injeções de concentrações crescentes de metalotioneína tipo I de coelho, nos quais a seta indica o pico referente à MT. O limite de detecção foi de $0,02 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . ....	65
<b>Figura 12.</b> Conteúdo de MT no fígado de tilápias expostas a Ferro, Cádmio, Chumbo, Cobre, Mistura desses metais e do Controle mantidos expostos durante 3, 7 e 14 dias. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle. ....	66
<b>Figura 13.</b> Níveis de MT no fígado de tilápias expostas durante 3 dias a Ferro, Cádmio, Chumbo, Cobre, Mistura desses metais, Benzo[a]pireno e Mistura com Benzo[a]pireno e Controle. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle. ....	68
<b>Figura 14.</b> Níveis de metalotioneínas em brânquias de tilápias expostas a Fe, Pb, Cd, Cu e mistura, além do controle durante 7 e 14 dias. ....	71
<b>Figura 15.</b> Conteúdo de MT hepática em tilápias expostas durante 7 dias a Ferro, Cobre, Chumbo, Cádmio e Mistura desses metais na ausência e com concentrações de 0,5; 1,5 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de SHA. Os resultados estão expressos em porcentagem de indução em relação ao grupo Controle. ....	72
<b>Figura 16.</b> Conteúdo de MT branquial em tilápias expostas durante 7 dias a Ferro, Chumbo e Cobre na ausência e na presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de SHA. Os resultados estão expressos em porcentagem de indução em relação ao grupo Controle. ....	73
<b>Figura 17.</b> Correlação entre concentração de Fe e Pb quantificados no tecido muscular e concentração de metalotioneínas quantificadas no tecidos dos peixes expostos a esses metais. ....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores das concentrações dos metais ferro, chumbo, cádmio, cobre e benzo[a]pireno estabelecidos pela Resolução Conama 357/2005.....	40
<b>Tabela 2.</b> Condições instrumentais empregadas na determinação de Cd, Cu, Pb e Fe. ....	44
<b>Tabela 3.</b> Gradiente de solvente empregado na determinação de metalotioneínas. ....	46
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros legislados pela Resolução Conama 357/2005 com valores preconizados para rios de Classe 2 e Classe 3. ....	50
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição. ....	51
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição. ....	52
<b>Tabela 7.</b> Valores obtidos na quantificação dos metais totais nas águas dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição em função da concentração de metais.....	55
<b>Tabela 8.</b> Valores obtidos na quantificação dos metais totais nas amostras de água dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição na presença de diferentes concentrações de SHA. ....	56
<b>Tabela 9.</b> Valores obtidos na quantificação dos metais totais e “livres” nas amostras de água dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição, para águas do rio Preto na proporção 1:1 (v/v).....	57
<b>Tabela 10.</b> Valores obtidos para metal “livre” e complexado nas amostras dos aquários dos experimentos de exposição na presença de SHA. ....	58
<b>Tabela 11.</b> Fator de bioacumulação no tecido muscular dos metais Fe e Pb para os experimentos de exposição.....	63
<b>Tabela 12.</b> Níveis de metalotioneínas em organismos aquáticos expostos a Cd e Cu, encontrados em trabalhos semelhantes.....	70

## SÚMÁRIO

1.	Introdução .....	15
2.	Revisão Bibliográfica .....	19
	2.1. Metais no ambiente aquático .....	20
	2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos .....	22
	2.3. Interação de metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com substâncias húmicas aquáticas .....	23
	2.4. Bioacumulação de metais em peixes .....	25
	2.5. Metalotioneínas como biomarcadores ambientais .....	28
	2.6. Tilápias do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	31
3.	Objetivo .....	34
	3.1. Objetivos específicos .....	35
4.	Parte Experimental .....	36
	4.1. Extração e Caracterização das Substâncias Húmicas Aquáticas do Rio Preto .....	37
	4.2. Experimentos de exposição de peixes a metais tóxicos.....	38
	4.3. Análises físico-químicas da água dos aquários.....	41
	4.4. Determinação de metais nas amostras de água e tecidos de peixes.....	41
	4.4.1. Preparo das amostras de tecidos de peixes: método de decomposição .....	42
	4.4.2. Técnicas empregadas na quantificação de metais na água e no tecido muscular dos peixes	43
	4.4.3. Cálculo do fator de bioacumulação.....	44
	4.5. Quantificação de metalotioneínas nos fígados e brânquias dos peixes por HPLC-FD .....	45
	4.6. Análise estatística dos dados.....	46
5.	Resultados e discussão .....	48
	5.1. Extração e Caracterização das SHA .....	49
	5.2. Parâmetros físico-químicos quantificados nas águas dos aquários.....	49
	5.3. Determinação de metais nas amostras de águas dos aquários .....	54

5.4.	Determinação de metais no tecido muscular dos peixes.....	58
5.5.	Bioacumulação de Fe e Pb no tecido muscular de tilápias .....	63
5.6.	Metalotioneínas como biomarcadores ambientais .....	63
5.6.1.	Adaptação do método para quantificação de metalotioneínas .....	64
5.6.2.	Avaliação do tempo de resposta e da concentração de contaminante na indução de Metalotioneínas .....	65
5.6.3.	Influência da presença de SHA na água na indução de metalotioneínas .....	72
6.	Conclusão .....	76
7.	Referências bibliográficas .....	78

# **1. INTRODUÇÃO**

Os ambientes aquáticos próximos a áreas urbanas e industrializadas são comumente contaminados com descargas de poluentes, por meio de lançamento de efluentes industriais e domésticos, deposição atmosférica, escoamento superficial agrícola e urbano, resultando no aporte de substâncias compostas por agentes químicos como metais ou compostos orgânicos, os quais são potencialmente tóxicos para a biota.

A contaminação dos ambientes aquáticos por metais é consequência de processos naturais ou da poluição decorrente das atividades antrópicas, representando considerável ameaça para as diferentes formas de vida ali existentes. Metais como chumbo e cádmio são frequentemente utilizados pelas indústrias cerâmicas (GOWD; GOVIL, 2008). O uso de defensivos agrícolas é considerado outra fonte de poluição de metais, pois podem conter em sua composição espécies dos íons cobre, cádmio e chumbo (TOMAZELLI et al., 2003; GOWD; GOVIL, 2008). Também é possível que ocorra contaminação de ambientes aquáticos por processos naturais e pelo intemperismo de rochas e solos, disponibilizando metais como o ferro o qual pode ocorrer naturalmente em alguns locais.

O benzo[a]pireno é um hidrocarboneto policíclico aromático e um dos compostos considerados pelo Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como cancerígeno estando contemplado na classe de Substâncias Tóxicas Persistentes. É um composto ubíquo no ambiente, oriundo de fontes biogênicas, petrogênicas ou pirogênicas sendo, para esta última, a queima da palha da cana-de-açúcar um dos grandes contribuintes para o incremento da concentração deste composto (SILVA et al., 2010).

A concentração de íons metálicos na água depende de fatores como, pH, temperatura e quantidade de matéria orgânica presente no meio, dentre outros. Sabe-se que a maior parte das moléculas orgânicas presentes em ambientes de água doce é composta pelas substâncias húmicas aquáticas (SHA), moléculas que possuem grupamentos reativos e são capazes de complexar metais e compostos orgânicos. Muitos trabalhos demonstraram que os metais quando complexados às substâncias húmicas tornam-se menos disponíveis nos ambientes para interação com a biota (ROMÃO et al., 2002; SANTOS et al., 2004; SANTOS et al., 2008). Estudos têm



avaliado a contaminação dos corpos aquáticos por metais por meio do seu monitoramento na coluna d'água (GALLO et al., 2006; ANTUNES et al., 2007; FARAG et al., 2007; MELO, 2010). Entretanto neste tipo de diagnóstico avaliado por meio de padrões de qualidade da água em função do seu uso, no caso dos corpos aquáticos inclui a proteção da vida aquática por meio de uma avaliação individualizada dos poluentes. Esta abordagem é importante, porém não garante a avaliação do efeito da mistura de poluentes para a segurança dos organismos que vivem no ambiente aquático. No caso do benzo[a]pireno por se tratar de um composto orgânico e afinidade por se depositar nos sedimentos, faz com que sua concentração na coluna d'água não seja facilmente detectada pelos métodos disponíveis, tornando mais interessante sua caracterização no sedimento ou a busca de outras estratégias de avaliação como o uso de biomarcadores para inferir sua presença no ambiente.

A legislação ambiental brasileira, como a Resolução Conama 357/05 estabelece padrões individuais de vários compostos prevendo a manutenção da vida aquática e de outros usos da água, sendo estes padrões derivados da avaliação individual e a mistura de poluentes não são considerados. Em contrapartida, tal Resolução também recomenda o emprego de ensaios de toxicidade para avaliação da qualidade de corpos aquáticos. Uma ferramenta que tem se mostrado promissora no monitoramento de poluentes em ecossistemas aquáticos é a utilização dos biomarcadores, que são definidos como alterações biológicas relacionadas à exposição a compostos presentes no ambiente, as quais podem ser observadas em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares (PEAKALL, 1994).

A expressão de metalotioneínas em tecidos de peixes após exposição a metais vem sendo considerado em diversos estudos ecotoxicológicos como biomarcador (CARVALHO et al., 2004; SCHMITT, 2007; COIMBRA, 2008). As metalotioneínas são proteínas de baixa massa molecular (6 a 7 kDa) e ricas em resíduos de cisteínas em sua estrutura, que por sua vez contém grupos tióis (KÄGI, 1991). Estes grupos conferem às mesmas a capacidade de se ligar com metais essenciais e não essenciais, tais como cádmio, cobre, mercúrio, prata e zinco sendo, portanto, uma proteína reguladora de metais nos organismos (KLAASSEN et al., 2001).

Apesar dos metais serem os mais bem conhecidos indutores de metalotioneínas, a síntese dessas proteínas também pode ser estimulada por diversos outros compostos como hormônios, além do estresse oxidativo (KÄGI, 1991). Alguns estudos demonstraram que a exposição de organismos aquáticos, tais como os peixes *Trematomus bernacchii* e *Fundulus heteroclitus*, a compostos orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dioxinas, também parecem induzir a expressão de metalotioneínas (VAN DEN HURK et al., 2000; REGOLI et al., 2005; ROESIJADI et al., 2009).

Desta maneira e considerando que os biomarcadores ambientais podem complementar a avaliação da qualidade de um corpo aquático, o emprego de tal ferramenta para avaliação da poluição ambiental pode ser considerado uma boa alternativa, principalmente quando de uma investigação qualitativa das classes de poluentes que afetam determinado corpo aquático, permitindo diagnosticar e prevenir efeitos adversos à biota.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 2.1. Metais no ambiente aquático

Os metais têm sido empregados nas atividades humanas desde a antiguidade, e se mantêm presentes no nosso cotidiano, o que tem contribuído para que esses elementos alcancem ambientes aquáticos, contaminando-os e aumentando os níveis de poluição em função dos processos de industrialização e urbanização (AGUSA et al., 2007; MOK et al., 2012). Essas atividades têm aumentado a quantidade e a distribuição de metais nos diferentes reservatórios naturais de águas, bem como no solo, sedimento, biota e na atmosfera.

Alguns metais, tais como Cu, Fe, Mn e Zn, são micronutrientes essenciais em processos de função fisiológica para a maioria dos seres vivos. No entanto, os limites toleráveis e as mudanças ambientais podem por sua vez afetar a biocinética de metais nos peixes levando a mortalidade, enquanto que concentrações subletais podem levar a mudanças comportamentais, bioquímicas e histológicas (WANG, 2002; AMIN et al., 2003). Os elementos não essenciais, tais como Al, Hg, Pb, Cd, Ag, Cr e Ni, são aqueles que não possuem função biológica e são geralmente tóxicos aos organismos, pois podem provocar uma série de distúrbios que podem levar à morte dos indivíduos (BARBOSA et al., 2010).

O chumbo é um metal bem distribuído globalmente, tendo seu aporte no ambiente oriundo de fontes naturais e antrópicas. O chumbo já foi empregado como aditivo na gasolina, e atualmente ainda é utilizado em alguns países, não no Brasil, para a produção de baterias usadas nas indústrias automobilísticas, nas indústrias extrativas, indústrias de tintas e corantes, indústrias de cosméticos, de cerâmica e bélica (LARINI, 1987). Um dos fatores mais importantes que influenciam a toxicidade do chumbo na água é a concentração de íons livres, que afeta a disponibilidade do chumbo aos organismos (CAVALCANTE, 2009). A exposição de peixes ao chumbo resulta na hiperprodução de muco nas brânquias e na pele, provoca distúrbios na regulação iônica, é responsável por inibir o crescimento e degenerar os túbulos renais (SORENSEN, 1991; TAO et al., 1999; OLIVEIRA, 2003). Para seres humanos, um mecanismo da toxicidade do Pb bastante conhecido é a interferência na biossíntese do grupamento heme e sua consequência mais conhecida é o aparecimento de anemia hipocrômica nos indivíduos pela

inibição da enzima delta aminolevulinato desidratase (ALA-D), ocasionada pela diminuição da formação do grupamento heme nos eritroblastos da medula óssea (HEATH, 1995; OLIVEIRA, 2003).

O Cádmio é empregado em indústrias de agroquímicos, pigmentos e galvanoplastia e pode ser disponibilizado no ambiente como subproduto da produção de aço, ferro, zinco, pigmentos, entre outros (USEPA, 2001). É um metal que se bioacumula em organismos aquáticos e em humanos causa danos renais e aos ossos, sendo considerado cancerígeno (PRETTO et al., 2010; RICHETTI et al., 2011).

O Cobre é empregado em indústrias de materiais para construção e como algicidas. A toxicidade de Cu em peixes associa-se a problemas sensoriais e no olfato, além de efeitos fisiológicos como desorientação (BALDWIN et al., 2011).

O Ferro está presente nas rochas e minerais sendo um dos elementos químicos mais abundantes, em baixas concentrações é um nutriente essencial para todos os seres vivos. Apesar disso, em altas concentrações o Fe pode inibir a atividade enzimática e tornar o organismo mais susceptível a doenças infecciosas (JABEEN; CHAUDHRY, 2010). O Fe está envolvido em diversos processos metabólicos como o transporte de oxigênio, o transporte de elétrons, a síntese de DNA e atua como cofator de muitas proteínas. Porém a sua forma livre pode ser tóxica, baseada no mecanismo de Fenton, onde o Fe pode reagir com intermediários reativos de oxigênio, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para produzir espécies altamente reativas, como o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). Células do sistema nervoso possuem poucas defesas antioxidantes e podem ser alvos da toxicidade do Ferro (SALVADOR et al., 2011).

A diferença entre a toxicidade de metais para os organismos depende da concentração do metal presente, da espécie química e da susceptibilidade do indivíduo. Devido a esses fatores, grande parte dos metais merece atenção por sua toxicidade e persistência, uma vez que são elementos estáveis, dependendo da concentração são prejudiciais às funções fisiológicas dos

organismos, não são metabolizados, e podem ser bioacumulados ao longo da cadeia alimentar (HEJABI et al., 2010; ALHASHEMI et al., 2012).

## 2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos constituídos de carbono e hidrogênio contendo no mínimo dois anéis aromáticos condensados. São originados principalmente a partir da combustão incompleta da biomassa e derivados de petróleo. Os HPA compõem uma classe de compostos denominados Substâncias Tóxicas Persistentes, tendo como principais características elevada toxicidade e persistência no ambiente (ALMEIDA et al., 2007; CARUSO; ALABURBA, 2008).

Os HPA são formados por fontes naturais como emissões vulcânicas, incêndios florestais além da síntese por plantas, bactérias e fungos, e fontes antrópicas como processos de combustão de biomassa e combustíveis fósseis, tais como, queima da palha da cana-de-açúcar e emissões automotivas sendo estas últimas as maiores contribuintes desses compostos no ambiente. A persistência dos HPA no meio ambiente é maior para aqueles com elevada massa molecular podendo ser anos, enquanto que para os de baixa massa molecular possuem tempo de meia vida de alguns dias (USEPA, 1998).

São 15 os HPA mais tóxicos classificados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) juntamente com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), os denominados HPA prioritários são naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, indano[123-cd]pireno e dibenzo[ah]antraceno.

Os HPA podem ser classificados em três diferentes grupos quanto sua origem. A petrogênica é caracterizada pelos HPA formados na queima do petróleo e de seus derivados. A pirogênica denota os HPA formados durante os processos de combustão da biomassa e a biogênica é caracterizada pelos HPA sintetizados por organismos vivos.

Dentre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o benzo[a]pireno (BaP) é um dos mais conhecidos e estudados. Devido aos grupos benzênicos quanto maior a massa molecular mais persistente será o HPA, sendo esta a justificativa para a persistência do BaP no ambiente ( $C_{20}H_{12}$ ) desse composto. Por ser um composto orgânico com  $Kow$  igual a  $10^6$ , o BaP, uma vez no ambiente aquático, tende a permanecer no sedimento, associado à matéria orgânica em suspensão ou ainda associado à biota (CARUSO; ALABURBA, 2008). A toxicidade dos HPA está relacionada com a estrutura desses compostos. No caso do BaP, sua estrutura apresenta uma região de baía, na qual ocorrem reações finalizadas pela ligação do HPA oxigenado após sua metabolização com uma base nitrogenada do DNA (LOCATELLI, 2006).

### **2.3. Interação de metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com substâncias húmicas aquáticas**

A matéria orgânica natural presente nos corpos aquáticos está envolvida em grande parte dos processos ambientais, sendo a maior parte dela constituída por substâncias húmicas aquáticas (SHA). As SHA são originadas a partir da decomposição de restos vegetais e animais presentes no solo, que transportados por lixiviação alcançam os corpos aquáticos, como também pela decomposição de plantas e organismos aquáticos, que após as transformações microbiológicas formam macromoléculas complexas, de coloração normalmente escura e elevada massa molecular (ROCHA; ROSA, 2003).

Os grupos que compõem as SHA apresentam uma estrutura complexa formada de anéis aromáticos e grupos funcionais reativos como ácidos carboxílicos, cetonas, grupos fenólicos, aminas, amidas, entre outros que devido à alta composição de oxigênio e nitrogênio apresentam uma alta capacidade de complexação com metais (ROMÃO et al., 2002).

Em corpos aquáticos naturais, vários ligantes apresentam uma capacidade de redução dos efeitos tóxicos de metais presentes via poluição antrópica. Alguns estudos apontam à importância das SHA na complexação de metais principalmente por formarem espécies menos disponíveis para a biota aquática (WOOD, 1996; ROMÃO et al., 2002; SANTOS et al., 2004; SANTOS et al.,

2008). Santos et al. (2008) estudaram o efeito das substâncias húmicas na toxicidade do cobre para o crustáceo *Ceriodaphnia silvestrii* e mostraram que a  $CL_{50}$  (concentração letal para que a metade dos indivíduos morram) para cobre total foi de  $4,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  na ausência de SHA e de  $1,1 \cdot 10^{-6}$  na presença de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de SH, aumentando assim a  $CL_{50}$  e, portanto, reduzindo a toxicidade do cobre total para o crustáceo. As substâncias húmicas formam complexos com metais como Cu e contribuem para a redução da sua toxicidade. Há na literatura muitos estudos que descrevem os efeitos das substâncias húmicas sobre a toxicidade do íon cobre(II) em corpos aquáticos (MA et al., 1999; LORENZO et al., 2002; CAO et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2005). Segundo Santos e colaboradores (2008), em ambientes onde há presença de maior quantidade de matéria orgânica dissolvida ocorre redução da biodisponibilidade do cobre, e conseqüente diminuição da toxicidade do metal para zooplânctons. Essa afirmação corrobora com Brooks e colaboradores (2007) os quais observaram que a toxicidade do Cu está relacionada com a concentração do íon livre.

De maneira geral, a presença de SHA tende a diminuir a biodisponibilidade de metais devido à ligação destes íons metálicos com os compostos oxigenados presentes nessas moléculas. Entretanto, parte do metal complexado não se encontra biologicamente indisponível. Contudo, Sánchez-Marín et al. (2007) ao testarem a concentração e a toxicidade de chumbo em invertebrados marinhos (*Mytilus edulis* e *Paracentrotus lividus*) na ausência e na presença de SH, observaram que a presença de SHA aumentou a acumulação de chumbo nos organismos e este efeito é maior em concentrações maiores de SHA. Esse comportamento foi explicado em virtude da matéria orgânica dissolvida modificar a voltagem celular dos organismos e induzir a abertura dos canais celulares e, sabendo-se que existe uma variedade de canais receptores de cálcio e que o chumbo apresenta um caminho semelhante ao cálcio, provavelmente o chumbo foi introduzido dentro da célula dos organismos mais facilmente. Lamelas et al. (2005) encontraram resultados semelhantes com relação ao aumento da concentração de chumbo em algas (*Chlorella kesslerii*) na presença de SHA. Considerando que estes compostos orgânicos sejam lipofílicos, é possível



concluir que a passagem do metal complexado através da membrana celular é facilitada, causando os efeitos tóxicos.

As interações das SHA com compostos orgânicos antropogênicos como os pesticidas, estão relacionadas com efeitos de adsorção e processos microbiológicos (CHOUDRY, 1982). Estudos mostram que o efeito da matéria orgânica dissolvida na água pode mitigar o impacto biológico desses contaminantes hidrofóbicos com elevado potencial de bioacumulação (LEVERSEE et al., 1983; MCCARTHY et al., 1985; DE PAOLIS; KUKKONEN, 1997). Em experimentos de exposição de *Daphnia magna* a HPA na presença de substâncias húmicas, Leverage e colaboradores (1983) observaram a diminuição significativa no acúmulo de benzo[a]pireno, comparando a exposição na ausência de substâncias húmicas. Nesse sentido, fica clara a relevância das SH devido a variedade de trocas capazes de fazer se ligando a metais e poluentes orgânicos, afetando a biodisponibilidade, toxicidade, acumulação em organismos aquáticos, além do transporte desses compostos na coluna d'água.

#### **2.4. Bioacumulação de metais em peixes**

A contaminação dos ambientes aquáticos por metais tóxicos afeta a biota existente e é consequência de processos naturais ou da poluição decorrente de várias fontes como derramamento de resíduos químicos, deposição atmosférica, efluentes industriais, escoamento agrícola e esgoto doméstico. Peixes são considerados bons bioindicadores de poluição aquática por metais devido à capacidade de concentrá-los em seus corpos (ADEYEYE et al., 1996). A capacidade de assimilação de compostos do meio externo por organismos através da dieta ou pelo contato direto com o contaminante dissolvido no meio é denominada bioacumulação. Peixes estão em níveis mais altos da cadeia alimentar e podem acumular maiores quantidades dos metais presentes na água, onde muitas vezes as concentrações de metais de interesse estão abaixo do limite de detecção pela maioria das técnicas analíticas comumente empregadas (KARADEDE et al., 2003; JABEEN; CHAUDHRY, 2010). Tais compostos podem apresentar-se em diferentes concentrações nos diferentes órgãos do animal de modo que uma maior concentração de metal acumulado ocorre em órgãos de contato direto com a água como músculo e barbatanas ou em

órgãos relacionados à captação, transporte, estoque e excreção de água para assimilação de oxigênio e nutrientes, como as brânquias, corrente sanguínea, fígado, rins e intestino.

A quantidade acumulada dependerá das taxas de absorção e dos processos de eliminação, bem como os níveis de metais presentes no ambiente aquático e o tempo de exposição (LICATA et al., 2005; JABEEN; CHAUDHRY, 2010). Fatores como pH e temperatura também são importantes na definição da especiação química predominante e solubilidade do metal. Geralmente, a toxicidade e biodisponibilidade são dependentes da solubilidade, que por sua vez, aumenta com a diminuição do pH ou com o aumento da temperatura (YILMAZ et al., 2010). Não são apenas as variáveis dos elementos químicos estudados e da qualidade da água os únicos fatores determinantes na disponibilidade e da toxicidade de metais. Um número de variáveis biológicas também desempenham um papel importante no que diz respeito ao acúmulo de metais. Deve-se destacar também variações entre espécies, o papel do sedimento como sumidouro ou fonte de contaminantes presentes em corpos naturais, bem como a presença natural ou de origem poluidora de matéria orgânica que podem agir complexando metais, e conseqüentemente, tornando-o menos disponível para interagir com a biota aquática (GIESY; WIENER, 1977; LOWE et al., 1985; KLILOUR, 1991).

A determinação da distribuição de metais em ambientes aquáticos (sedimento, água e biota) tem sido alvo de diversos estudos há décadas, destacando a bioacumulação de metais na vida aquática, especialmente nos peixes, merece um interesse especial devido aos efeitos tóxicos diretos para os animais aquáticos, bem como pode ser prejudicial a saúde das pessoas pelo consumo do alimento contaminado. Assim peixes têm sido empregados como indicadores do potencial de poluição de metais e muitos estudos têm sido realizados sobre a acumulação de metais em diferentes tecidos de peixes de corpos aquáticos de água doce (ADEYEYE et al., 1996; ZHOU, 1997; LICATA et al., 2003; ALHASHEMI et al., 2012).

A contaminação aquática por metais levou ao aumento dos estudos relacionados à acumulação destes compostos em peixes em diferentes ecossistemas aquáticos do mundo (RASHED, 2001; LICATA et al., 2003; KARADEDE et al., 2003; LICATA et al., 2004). Tais

estudos revelaram que ocorre a bioconcentração nos tecidos de organismos aquáticos estudados podendo, eventualmente constituir riscos a saúde da população onde há pesca e consumo desses animais (ADEYEYE et al., 1996; KARADEDE et al., 2003; PRZYTARSKA et al., 2010). A influência do tamanho e peso dos animais na concentração de metal presente no tecido muscular é um tanto ambígua. Alguns autores relataram que quanto maior o peso e tamanho do peixe, menor será o nível de metal acumulado, fazendo com que ocorra um efeito de diluição devido ao crescimento do animal (RASHED, 2001; CANLI; ATLI, 2003). Por outro lado, também foi observado que animais maiores possuem maior superfície de contato com o meio aquático contaminado, levando a uma maior absorção do contaminante (LIANG et al., 1999; QIU et al., 2011).

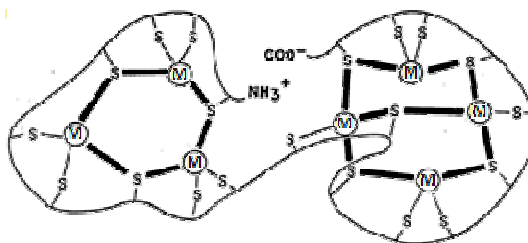
A absorção e a retenção de um contaminante por um organismo podem acarretar no bioacúmulo do mesmo, com probabilidade de causar efeitos deletérios, podendo ocorrer por absorção direta, no ambiente, ou por absorção indireta, por meio da ingestão de alimentos contaminados. De acordo com Zagatto e Bertolotti (2006), o termo bioacumulação é designado para processos em que substâncias químicas provenientes do ambiente são assimiladas e retidas pelos organismos. Inclui absorção a partir de todas as vias de exposição (respiração, nutrição, epiderme) e compartimentos em que os contaminantes estejam presentes no meio aquático (água, sedimento, outros organismos). E o termo bioconcentração como uma maneira mais específica de se designar a acumulação de compostos químicos exclusivamente a partir da fase aquosa, como as condições de estudo deste trabalho. No processo de adsorção de substâncias dissolvidas ou na forma coloidal na água para o peixe, os contaminantes presentes no ambiente permeiam as brânquias ou o trato digestivo, sendo transportados pelo sangue para os diferentes tecidos, onde podem atingir concentrações na ordem de dezenas a centenas de vezes as encontradas na água (MANAHAN, 1997). Destaca-se que a bioconcentração ou a bioacumulação dependerão do tempo de exposição que do organismo a determinado xenobiótico, sendo que em estudos de experimentos geralmente emprega-se o tempo de exposição de 3 dias (HEATH, 1995).

A presença de poluentes no ambiente em concentrações elevadas (na ordem de miligramas) pode gerar uma série de efeitos para os organismos presentes, principalmente devido a capacidade de muitos compostos acumularem em diferentes tecidos nos organismos ao longo da cadeia trófica. A contaminação de corpos aquáticos é uma preocupação para a prática de piscicultura, devido ao aumento da procura por peixes, como fonte de proteína na dieta da população mundial (CARITÁ, 2010).

### 2.5. Metalotioneínas como biomarcadores ambientais

Biomarcadores são quaisquer medidas que possam refletir a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico, e abrangem respostas a mudanças no ambiente seja no ecossistema ou em níveis subcelulares (AZEVEDO; CHANSIN, 2003).

As metalotioneínas (MT) são proteínas ricas em grupos tióis, os quais conferem a capacidade de se ligar a metais, desempenhando o papel de detoxificação do organismo. A indução da expressão de MT em diferentes tecidos de organismos aquáticos expostos ao excesso de metais e o fato de que estas proteínas são intrínsecas à maioria das espécies torna-a um possível biomarcador ambiental, sendo inclusive indicada pela Comissão Europeia e outras organizações científicas internacionais para ser incluída em programas de monitoramento ambiental (DABRIO, 2002). Na Figura 1 está representada a estrutura da metalotioneína ligada a sete íons metálicos.



**Figura 1.** Representação da metalotioneína, contendo domínios  $\alpha$  e  $\beta$  capazes de se ligar a até 4 e 3 átomos de metais, respectivamente (Adaptado de KLASSEN et al., 1999).

Atualmente, muitos trabalhos envolveram o estudo das metalotioneínas em diferentes organismos (ROESIJADI, 1996; BOURAOUI et al., 2007; ROMERO-RUIZ et al., 2008; VANPARYS et al., 2008; GHEDIRA et al., 2010; FANG et al., 2012). Schmitt (2007) evidenciou a possibilidade de correlacionar níveis da proteína com concentrações de zinco em fígado de três espécies de peixes (*Campostoma oligolepis*, *Lepomis megalotis* e *Hypentelium nigricans*), ao passo que Tonissi (2009) efetuou experimentos com os metais cádmio, cobre e zinco em tilápias e verificou alterações das metalotioneínas, entre outros parâmetros bioquímicos, observando a elevação da concentração destas para a maioria dos metais. A utilização dessa proteína como biomarcador foi sugerida para avaliar a contaminação por cobre em ambientes aquáticos por meio de sua indução em peixes (*Prochilodus scrofa*) (CARVALHO et al., 2004). As concentrações de MT no referido estudo alcançaram valores de até 126,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 167,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  em pH 4,5 e 8,0 respectivamente, demonstrando a influência deste parâmetro na expressão da MT. Atli e Cali (2007) efetuaram ensaios de exposição para tilápias do Nilo aos metais Cu, Zn Cd e Pb por 14 dias, mas apenas o experimento na presença de Cd apresentou aumento na indução das MT.

A indução de MT não só é avaliada em condições laboratoriais, mas também já tem sido utilizada como ferramenta para o monitoramento ambiental (LINDE et al., 1999; AZEVEDO et al., 2009; BERNAL-HERNNDEZ et al., 2010; STROGYLOUDI et al., 2012). Pathiratne e colaboradores (2009) utilizaram tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para avaliar o impacto da poluição em um corpo aquático no Sri Lanka, e obtiveram resultados elevados em comparação com indivíduos controle mantidos em laboratório. Peixes dessa mesma espécie foram utilizados como organismos sentinelas - que reagem sensivelmente a quaisquer alterações no meio e são importantes para monitoramento de rios e lagos – para o rio Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro, Brasil (LINDE-ARIAS et al., 2008). Os autores observaram maiores níveis de indução de MT em peixes coletados na área mais industrializada e degradada e menores níveis em peixes de uma área agrícola. Foram observadas ainda altas taxas de indução de metalotioneínas em

peixes coletados em um ponto a montante de uma estação de tratamento de água da cidade do Rio de Janeiro.

Além dos metais, a exposição de organismos aquáticos a compostos orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos também parecem induzir a expressão de MT, como demonstrado por Roesijadi e colaboradores (2009), no qual peixes (*Fundulus heteroclitus*) foram alimentados com doses de Cd, benzo[a]pireno e a ambos juntos durante 7 dias, sendo observado aumento nos níveis da MT para os dois contaminantes. Quando benzo[a]pireno foi administrado juntamente com Cd, a indução de MT foi reforçada pela presença do HPA. Um comportamento semelhante foi observado por van den Hurk e colaboradores (2000), os quais relataram que a indução de MT hepática em peixes dessa mesma espécie foi potencializada após injeção intraperitoneal de Cd e BaP, quando comparado com a injeção de apenas Cd. Além disso, níveis de MT em peixes (*Trematomus bernacchii*) injetados com uma mistura de cádmio e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina são mais elevados do que os níveis de MT resultantes da injeção de cádmio somente (REGOLI et al., 2005).

Dabrio e colaboradores (2002) revisaram métodos empregados para quantificação de metalotioneínas apresentando suas vantagens e desvantagens. O método eletroquímico, apesar da alta sensibilidade, exige amostras com ausência de impurezas eletroativas, que possam interferir na análise. Outra opção é o emprego do método da imunorreatividade no qual, apesar da maior sensibilidade obtida (ng/100µg), necessita que o anticorpo utilizado deva ser específico. Jebali et al. (2008) realizaram experimentos de exposição de peixes (*Dicentrarchus labrax*) aos metais Cu, Cd e Hg e avaliaram a eficiência dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico para a quantificação de MT. Observou-se que níveis de MT quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência (HPLC-FD) aumentaram linearmente com o aumento da concentração dos metais e foram significativamente mais altos quando comparados àqueles obtidos pelo método espectrofotométrico.

A preferência pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência para quantificação de metalotioneínas para avaliar a poluição por metais também

foi demonstrada por Dabrio (2002) e Romero- Ruiz e colaboradores (2008), devido ao alto grau de resolução e à sua maior sensibilidade e especificidade. Apesar do grande número de métodos disponíveis para quantificação das MT, a comparação dos resultados obtidos em diferentes pesquisas torna-se difícil devido à ausência de um material de referência para MT. Assim, para uma quantificação satisfatória de MT, alguns cuidados devem ser tomados principalmente em relação ao bom isolamento e purificação da amostra do material biológico (DABRIO, 2002).

### **2.6. Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

O estudo dos efeitos de substâncias tóxicas sobre os organismos aquáticos, como os peixes tem sido muito utilizado na área da ecotoxicologia (TONISSI, 2009). As respostas fisiológicas dos peixes expostos a contaminantes, como metais, são muito importantes de serem estudadas, com a finalidade de obter informações importantes sobre um determinado corpo aquático, por exemplo.

Muitos estudos têm sido realizados com a utilização da espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma espécie fortemente introduzida no Brasil. Originada da África, vive em muitos outros países com clima tropical, é bastante resistente e onívora (ALHAMA et al., 2006). Por essas características, Tilápias do Nilo são amplamente distribuídas em ecossistemas tropicais, e um dos peixes mais importantes na atividade da piscicultura no Brasil, possuindo grande capacidade de inserção e adaptação a diversos tipos de habitat (RODRIGUEZ-FUENTES; GOLD, 2004). A Figura 2 ilustra uma imagem da espécie.



**Figura 2.** Foto de uma tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Acredita-se que, no Brasil, metade da produção anual de peixes cultivados seja de tilápias (BRASIL, 2012). No mundo, é a segunda espécie mais cultivada. Essa espécie apresenta como principais características, que contribuem para esse bom resultado: rusticidade, extrema resistência a condições adversas do meio e enfermidades, crescimento rápido e adaptação ao confinamento, hábito alimentar onívoro, e aceitação de rações com grande facilidade. Além disso, entre as espécies de peixes mais cultivadas tem melhor resistência a alta temperatura, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água (KUBITZA, 1999; CAVALCANTE, 2009).

Já foram reportados estudos que confirmam que a espécie tilápia do Nilo pode ser empregada como bioindicador de poluição por chumbo e cádmio (RASHED, 2001), bem como estudos com essa espécie para avaliação da resposta toxicológica a diversos xenobióticos (RODRÍGUEZ-FUENTES; GOLD, 2004; JOS, et. al., 2005; ATLI et al., 2006; SOUZA; FONTANELLI, 2006; ATLI; CANLI, 2007; CAVALCANTE, 2009). Linde-Arias e colaboradores (2008) realizaram estudos de monitoramento no rio Paraíba do Sul, este que é um rio altamente degradado, possui 1145 quilômetros de comprimento e está localizado na região de centros urbanos e industriais mais importantes no Brasil. Os organismos analisados foram tilápias do Nilo, devido a sua abundância e distribuição generalizada nesse corpo aquático. Eles



observaram ainda, que essa espécie de peixe possui boa resposta quanto à exposição a substâncias químicas. Desse modo, o biomonitoramento como ferramenta da avaliação da poluição ambiental utilizando *Oreochromis niloticus* pode ser considerado uma boa alternativa por serem animais resistentes a alterações no meio aquático e para fins de comparação de resultados obtidos em outros trabalhos.

A resolução Conama 357/2005 estabelece valores máximos de concentração de diversos poluentes em função dos diferentes usos da água, sendo que para rios classe 1, 2 e 3 busca-se como uma das prioridades a proteção da vida aquática. Neste contexto estudar a biocumulação de metais para espécies amplamente distribuídas no país com relação às concentrações preconizadas na legislação ambiental é de grande valia.

### **3. OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a influência das substâncias húmicas aquáticas na disponibilidade de metais individuais (Cd, Cu, Pb e Fe) e na mistura, bem como do benzo[a]pireno na indução de metalotioneínas em peixes como biomarcador ambiental.

### 3.1. Objetivos específicos

- a) Adaptação e otimização dos métodos para quantificação de Metalotioneínas e determinação das figuras de mérito.
- b) Realização de experimentos expondo tilápias (*Oreochromis niloticus*) a metais (Cd, Cu, Pb e Fe) e benzo[a]pireno na ausência de Substâncias Húmicas Aquáticas e mistura de metais e mistura de metais e benzo[a]pireno.
- c) Realização de experimentos expondo tilápias (*Oreochromis niloticus*) a metais (Cd, Cu, Pb e Fe) na presença de Substâncias Húmicas Aquáticas.
- d) Realização de experimentos expondo tilápias (*Oreochromis niloticus*) a mistura de metais (Cd, Cu, Pb e Fe) na presença e ausência de Substâncias Húmicas Aquáticas.
- e) Determinação de metalotioneínas nos fígados dos espécimes de tilápias e seu possível emprego como biomarcadores ambientais.
- f) Determinação do acúmulo de metais nos tecidos musculares dos peixes e correlacionar com os níveis de metalotioneínas.
- g) Determinação de Cd, Cu, Pb e Fe nas amostras de água dos aquários para fins de confirmação das concentrações de metais no início e final dos experimentos.
- h) Determinação do metal “livre” empregando sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial para os experimentos na presença de substâncias húmicas aquáticas.
- i) Cálculo do fator de acumulação dos metais no tecido muscular.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

#### 4.1. Extração e Caracterização das Substâncias Húmicas Aquáticas do Rio Preto

A amostragem de água para a extração de Substâncias Húmicas Aquáticas foi feita no rio Preto (S20°48'40.94''O49°21'13.62'') localizado na região noroeste do estado de São Paulo, situado na cidade de São José do Rio Preto. O local escolhido é empregado para diversos fins, sendo classificado como rio classe 2, e nasce em uma região agrícola que vem passando por mudanças com a ampla expansão do cultivo da cana-de-açúcar, sendo o local de amostragem na área urbana, coincidente com o local de captação de água para fins de abastecimento público. Para extração, foi utilizado o procedimento sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). As amostras de água do Rio Preto foram coletadas em galões de 50 L previamente limpos e lavados com água do próprio corpo aquático. Em seguida, as amostras foram levadas ao laboratório, filtradas em papel qualitativo para a remoção de sólidos e partículas suspensas, sendo em seguida acidificadas com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> até pH 2. A resina macroporosa XAD utilizada para a extração de SHA foi previamente ativada, primeiro com soluções de ácido clorídrico 0,50 mol L<sup>-1</sup> por um período de 24 horas (agitando levemente pelo menos três vezes nesse período). Após as 24 horas, a resina foi lavada com água destilada e o mesmo procedimento foi realizado com hidróxido de sódio 0,50 mol L<sup>-1</sup> e posteriormente com metanol. Em seguida percolou-se (por gravidade) as amostras através de colunas de vidro empacotadas com resina, com fluxo de 4,0 mL min<sup>-1</sup> para reter ácidos húmico e fúlvico. Após saturação, verificada pelo escurecimento da resina, percolou-se 10,0 mL de solução de ácido clorídrico 0,01 mol L<sup>-1</sup> para a remoção de impurezas e em seguida foi feita a eluição com solução de hidróxido de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>. O pH das amostras de SHA foi ajustado para o valor inicial das amostras de água coletadas para extração. Em seguida, as amostras foram liofilizadas obtendo amostras sólidas de SHA. Após a primeira eluição a resina foi novamente purificada e tratada usando o mesmo procedimento descrito acima, podendo ser utilizada novamente. A Figura 3 ilustra o procedimento. Os resíduos gerados foram acondicionados em recipientes apropriados, etiquetados e estocados em local ventilado, encaminhados ao entreposto de responsabilidade da Comissão de Ética Ambiental que dará o tratamento adequado para os resíduos.



**Figura 3.** Esquema de extração das SHA do Rio Preto, passando pela coleta, filtração, percolação nas colunas, eluição e finalmente obtenção das mesmas.

A caracterização das SHA foi feita por TADINI (2013) empregando as técnicas de espectrofotometria no UV-Visível, fluorescência molecular, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear, *Off-line TMAH-Thermochemistry* – *GC/MS* e a determinação da composição elementar foi realizada empregando um analisador elementar CE Instruments, modelo EA 1110 disponível na Central de Análises Químicas Instrumentais, do Instituto de Química de São Carlos.

#### 4.2. Experimentos de exposição de peixes a metais tóxicos

Este trabalho esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, protocolo n.º. 043/2011 Comitê de Pesquisa Animal (CEUA). Espécimes machos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), oriundas do Centro de Aquicultura da UNESP de São José do Rio Preto, supervisionado pela

prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Gonçalves de Freitas, com dimensões de 11 a 18 cm e massa variando de 40,0 a 146,0 g (Anexos de 1 a 4) foram aclimatados a condições laboratoriais em tanques de 200 L por 10 dias e posteriormente alocados em aquários individuais e submetidos à exposição a concentrações regulamentadas pela legislação ambiental brasileira, a resolução Conama 357/2005 para rios classe 2, classe 3 e a uma concentração 5 vezes maior que aquela referente a classe 3 de metais isolados (Cádmio, Cobre, Chumbo e Ferro) e benzo[a]pireno bem como a mistura desses contaminantes, conforme mostrado na Tabela 1 e Figura 4 (N=5 animais isolados por contaminante). Cinco aquários permaneceram sem tratamento, como grupo controle. Os experimentos foram mantidos durante 3, 7 e 14 dias e, durante o experimento de 14 dias foi efetuada uma troca de água e renovação das concentrações de contaminante. Esta medida foi necessária em virtude do incremento das concentrações de alguns parâmetros avaliados. Além disso, foram efetuados experimentos na ausência e na presença de substâncias húmicas aquáticas (0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>).

Paralelamente um experimento semelhante foi conduzido empregando amostra de água superficial e água do aquífero Guarani anterior à cloração, na proporção (1:1), uma vez que em experimento piloto com a água superficial do rio Preto sem diluição houve mortalidade dos peixes. A água superficial foi obtida no mesmo corpo aquático (rio Preto) em que se extraíram as SHA para a realização dos experimentos. No momento da coleta os valores de pH, condutividade, oxigênio dissolvido e turbidez, medidos em triplicata foram de 6,4±0,5, 17,1±2,2 µS cm<sup>-1</sup>, 7,6±2,0 mg L<sup>-1</sup> e 11,8±5,6 NTU, respectivamente. A concentração dos metais totais Fe, Pb, Cd e Cu nas amostras de águas superficiais do rio Preto no momento da coleta foram de 0,74±0,01 mg L<sup>-1</sup> e 1,45±0,16; 1,64±0,01 e 2,84±0,27 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de carbono orgânico dissolvido total nas amostras de água do rio Preto foi de 4,4±0,1 mg L<sup>-1</sup>, onde 50% representa a substância húmica aquática.

Os sais dos metais utilizados para o preparo das soluções de Fe 100,0 mg L<sup>-1</sup>, Pb 500,0 mg L<sup>-1</sup>, 100,0 Cd mg L<sup>-1</sup> e Cu 100,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparados a partir do sal FeCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>

e  $\text{CuCl}_2$ , respectivamente. Todos os sais foram de elevado grau de pureza (Fluka, Sigma-Aldrich). O benzo[a]pireno  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparado a partir da diluição em acetonitrila.

**Tabela 1.** Valores das concentrações dos metais ferro, chumbo, cádmio, cobre e benzo[a]pireno estabelecidos pela Resolução Conama 357/2005.

Resolução Conama 357/05	Classe 2	Classe 3	5 x Classe 3
Ferro dissolvido	$0,3 \text{ mg L}^{-1}$	$5,0 \text{ mg L}^{-1}$	$25,0 \text{ mg L}^{-1}$
Chumbo total	$10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$33 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$165 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
Cádmio total	$1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
Cobre dissolvido	$9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$13 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$65 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
Benzo[a]pireno	$0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$0,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	$3,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$

Após o tempo de exposição, os animais foram coletados, anestesiados com 2-fenoxietanol, e tiveram seus fígados e músculos retirados para análise. Fígados foram estocados a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior quantificação das metalotioneínas e os músculos foram estocados a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior quantificação de metais. As carcaças foram armazenadas em refrigeradores e recolhidas por uma empresa responsável pela destinação correta (Nogueira et al., 2011).



**Figura 4.** Foto dos experimentos de exposição de tilápias a metais. No detalhe observa-se que cada aquário continha uma tilápia.



### 4.3. Análises físico-químicas da água dos aquários

Os procedimentos de amostragem e preservação das amostras de água dos experimentos de exposição a metais e do Controle, para a quantificação de carbono orgânico total, sulfato, nitrato, amônia e fosfato seguiram as recomendações propostas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 9898 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1987). Os parâmetros pH, Oxigênio Dissolvido (OD), Turbidez e Temperatura foram medidos diretamente nos aquários utilizando equipamentos multiparâmetros (modelos HI991300, HI9146-04, HI93703C, Hanna) previamente aferidos. Os parâmetros sulfato (método 4500E), nitrato (método 4500B), fósforo (método 4500PE), amônia (método do Salicilato de Sódio, KROM, 1980) foram quantificados em laboratório seguindo as recomendações descritas em métodos oficiais (APHA, 2005). O Carbono Orgânico Total foi determinado empregando um Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC-VCSH, Shimadzu). O estoque de metais Cd, Cu, Pb e Fe em amostras de água foram determinados empregando as recomendações contidas no método 200.2 da EPA empregando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Atomização por Chama ou por Forno de Grafite, marca Varian, Modelos FS-240 e AA-280Z.

### 4.4. Determinação de metais nas amostras de água e tecidos de peixes

Alíquotas de 50 mL de água de cada um dos aquários foram coletadas em frascos de plástico no início e ao fim dos experimentos de exposição e as amostras foram preservadas com ácido nítrico 5% (v/v) e estocadas em geladeira para posterior análise. Os frascos utilizados foram previamente descontaminados em banho ácido (HCl 5% v/v). Imediatamente após a coleta, as amostras foram estocadas a aproximadamente 4°C até as análises. Todas as amostras de tecidos de peixe foram estocadas em freezer a -20 °C para serem posteriormente decompostas empregando o método proposto por *U.S. Geological Survey* (1996).

Nos experimentos com adição de SHA, para a determinação dos metais denominados "livres" foi empregado o Sistema de Ultrafiltração com Fluxo Tangencial (SUFT), o qual era provido de uma membrana de poliétersulfona com diâmetro de corte de 1,0 kDa que permite a

passagem apenas do metal "livre", ou seja o metal não complexado com as SHA (BURBA et al. 2001). Ao final dos experimentos, alíquotas de 30 mL de água de cada aquário foram coletadas, submetidas à passagem no SUFT, preservadas com ácido nítrico 5% (v/v) e estocadas em geladeira para posterior análise dos metais.

A concentração dos metais Cd, Cu, Pb e Fe total e "livre" em amostras de água foram quantificados empregando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Atomização por Chama ou por Forno de Grafite, marca Varian, Modelos FS-240 e AA-280Z. Padrões de controle e um material de referência certificado (SRM 1640a) foram incluídos entre os lotes de amostra para avaliar a qualidade dos resultados. Destaca-se ainda que o Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais tem participado de Ensaio de Proficiência oferecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) para determinação de metais em amostras de tecido vegetal e de água, respectivamente, tendo atendido os padrões da área.

#### **4.4.1. Preparo das amostras de tecidos de peixes: método de decomposição**

Para a decomposição das amostras de tecido muscular dos peixes, emprego-se o método proposto por *U.S. Geological Survey* (1996). Para isso, adicionou-se 4,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado a 1,5 g de amostra úmida e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 12 horas. Então a mistura foi aquecida a  $70 \pm 5$  °C em bloco digestor até ausência de fumos. Em seguida, após a amostra ter resfriado, adicionou-se 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) à mistura e deixou-se a amostra em repouso à temperatura ambiente novamente durante 12h. Após esse período, a amostra foi novamente aquecida a  $70 \pm 5$  °C no bloco digestor até não mais exalar fumos de óxido nítrico. Por fim, a amostra foi filtrada com papel de filtro *whatman* nº 41 e o filtrado foi coletado em um balão volumétrico de 25,0 mL, aferindo-se o volume indicado com água deionizada (Figura 5). Esse procedimento foi realizado em triplicata tanto para as amostras quanto para o branco.



**Figura 5.** Foto dos experimentos de exposição de tilápias a metais. No detalhe observa-se que cada aquário continha uma tilápia.

#### **4.4.2. Técnicas empregadas na quantificação de metais na água e no tecido muscular dos peixes**

Em todas as amostras de água a determinação dos metais Cd, Cu, Pb e Fe foi realizada empregando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Atomização por Chama (FAAS), (Varian, AA240FS) e/ou o Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS), (Varian, AA280Z). A confiabilidade analítica dos resultados foi verificada com o emprego de material referência certificado (SRM 1640a).

Na Tabela 2 são mostradas as condições instrumentais para análise dos metais cádmio, cobre, chumbo e ferro sugeridas pelo fabricante do equipamento além de consulta das condições instrumentais utilizadas em estudos semelhantes (Varian, 1988 e Volynskii, 2003).

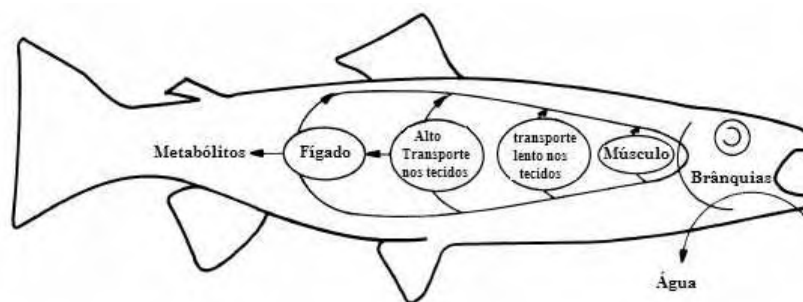
**Tabela 2.** Condições instrumentais empregadas na determinação de Cd, Cu, Pb e Fe.

GFAAS	Comprimento de onda (nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (l/min)	Leitura
Cádmio	228,8	0,5	4,0	85	5,0	0,3	Não
				95	40,0	0,3	Não
				120	10,0	0,3	Não
				250	5,0	0,3	Não
				250	1,0	0,3	Não
				250	2,0	0,0	Não
				1800	0,8	0,0	Sim
				1800	2,0	0,0	Sim
Cobre	327,4	0,5	4,0	85	5,0	0,3	Não
				95	40,0	0,3	Não
				120	10,0	0,3	Não
				800	5,0	0,3	Não
				800	1,0	0,3	Não
				800	2,0	0,0	Não
				2300	0,8	0,0	Sim
				2300	2,0	0,0	Sim
Chumbo	283,3	0,5	10,0	85	5,0	0,3	Não
				95	40,0	0,3	Não
				120	10,0	0,3	Não
				800	5,0	0,3	Não
				800	3,6	0,3	Não
				800	3,6	0,0	Não
				2100	0,9	0,0	Sim
				2100	2,0	0,0	Sim
FAAS	Comprimento de onda (nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Chama			
Ferro	248,3	0,2	5,0	Ar/Acetileno			

#### 4.4.3. Cálculo do fator de bioacumulação

A bioconcentração aplica-se principalmente à absorção de substâncias dissolvidas ou na forma coloidal na água para o peixe, onde o contaminante presente na água atravessa suas brânquias, sendo transportado pelo sangue para os diferentes tecidos, como representado na

Figura 6, apresentando concentração maior do que aquela a qual foi exposto (AKSU et al., 1996). O cálculo do Fator de bioacumulação (FB) de Cd, Cu, Fe e Pb foi efetuado dividindo-se a concentração encontrada do metal no tecido do peixe pela concentração do metal na água (MACKAY, 2000).



**Figura 6.** Representação esquemática simplificada do modelo de bioacumulação de um composto absorvido através das brânquias, transportado pelo fluxo sanguíneo, armazenado em diversos tecidos e metabolizado pelo fígado (Adaptado de BARRON, 1990).

#### 4.5. Quantificação de metalotioneínas nos fígados e brânquias dos peixes por HPLC-FD

A determinação dos níveis de metalotioneínas seguiu as recomendações descritas por Alhama e colaboradores (2006). Este método consiste na derivatização das metalotioneínas utilizando o reagente monobromobimano, que se liga com os grupos tióis presentes na proteína, conferindo a esta a propriedade de fluorescência. O fígado foi descongelado em isopor com gelo. Foram pesados 100,0 mg da amostra em papel alumínio os quais foram transferidos para um eppendorf seguido da adição de 300,0  $\mu\text{L}$  de solução tampão Tris-HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e homogeneização com um Mixer (Marconi MA102/MINI). Centrifugou-se o extrato por 60 minutos a 50.000  $\times g$  (Beckman Coulter, modelo Allegra 64R). Para desnaturação e derivatização, adicionou-se, em outro eppendorf: 57,6  $\mu\text{L}$  do sobrenadante; 26,4  $\mu\text{L}$  da solução tampão Tris-HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ; 10,0  $\mu\text{L}$  da solução de ditioneína (DTT) 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ; 2,0  $\mu\text{L}$  da solução de

etilenodiamidotetracético (EDTA)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 30%. Esta solução foi aquecida a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos para redução e desnaturação em bloco aquecedor (Marconi MA4004). Para derivatização, adicionou-se às soluções nos eppendorfs,  $10,0 \text{ }\mu\text{L}$  de monobromobimano (mBBr), os quais foram recobertos com papel alumínio e mantidos em incubação na ausência de luz. Todas essas etapas foram efetuadas também para os padrões da curva. As amostras foram filtradas em membrana de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  de poro imediatamente antes da injeção no equipamento.

A quantificação de metalotioneínas nas amostras foi obtida com o auxílio de um HPLC-FD, empregando coluna C-18 ( $0,46 \times 25 \text{ cm}$  e  $5 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula), a partir da injeção das soluções de concentrações  $0,6 \text{ }\mu\text{g } 20 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ ;  $1,8 \text{ }\mu\text{g } 20 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ ;  $3,0 \text{ }\mu\text{g } 20 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$  e  $4,2 \text{ }\mu\text{g } 20 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$  de padrões autênticos de metalotioneína tipo I de coelho (Sigma Aldrich). O tempo de corrida foi de 30 minutos e os solventes utilizados foram água ultrapura (Direct Q, Millipore) 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (linha A) e acetonitrila 0,1% de ácido trifluoroacético (linha B), alterando a porcentagem de cada um conforme apresentado na Tabela 3. Configurou-se para comprimento de onda de excitação em 382 nm e de emissão em 470 nm.

Os padrões comerciais de metalotioneínas bem como todos os reagentes utilizados na quantificação por HPLC-FD foram de grau cromatográfico (Fluka, Sigma-Aldrich).

**Tabela 3.** Gradiente de solvente empregado na determinação de metalotioneínas.

Tempo (minutos)	Porcentagem de solvente linha A (Água deionizada/TFA)	Porcentagem de solvente linha B (Acetonitrila/TFA)
1 a 10	70	30
11 a 21	30	70
21 a 30	70	30

#### 4.6. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas empregando o *software* STATISTICA 7 (StatSoft). Foram testadas as diferenças estatísticas entre o grupo controle e as diferentes

concentrações de contaminantes utilizadas bem como os diferentes tempo de exposição explorados. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk's W para avaliar a normalidade dos dados, sendo resultados com  $p > 0,05$  considerados normais. Para avaliar a variância dos dados foi utilizado o teste de Levene, sendo resultados com  $p < 0,05$  considerados paramétricos. Para identificar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos expostos e controle, realizou-se o teste do tipo ANOVA One-Way para dados paramétricos e Kruskal-Walis para dados não-paramétricos, sendo resultados com  $p < 0,05$  considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o teste de Fisher LSD a fim de distinguir entre quais grupos houve diferença estatística apontada pelo teste de ANOVA (ZAR, 1984).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



### 5.1. Extração e Caracterização das SHA

A caracterização das substâncias húmicas aquáticas do rio Preto utilizadas nos experimentos de exposição neste trabalho foi feita por TADINI (2013). Foi observado que tais SHA possuem na sua estrutura grupamentos aromáticos, carboxílicos, carbonílicos, ácidos graxos de metil ésteres, derivados de polissacarídeos, biopolímeros alifáticos derivados de plantas, hidrocarbonetos de cadeia longa e ramificada com grupos metilenos e carbono alquilas, resultados estes que foram evidenciados nos espectros de Ultravioleta Vísivel (UV-Vis), Infravermelho com Transformada de Fourier, Ressonância Magnética Nuclear e off-line TMAH-Thermochemolysis-GC-MS, e uma maior presença de ácido húmico na sua estrutura o qual foi evidenciado por Fluorescência Molecular.

Assim, as SHA do rio Preto podem afetar favoravelmente a retirada de metais do ambiente aquático, devido à sua estrutura composta por grupos funcionais, os quais podem interagir com íons metálicos. Esse papel das SH se torna importante uma vez que tornam esses compostos menos biodisponíveis, protegem a biota de possíveis efeitos tóxicos decorrentes da exposição. Melo et al. (2012) demonstraram que as SHA do rio Preto não possuem uma boa capacidade de complexar íons metálicos, apresentando constantes de estabilidade condicional para  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{CrO}_4^{2-}$  iguais a  $2,0 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,1 \cdot 10^{-5}$  e  $2,6 \cdot 10^{-2}$ , respectivamente, quando comparado a outros trabalhos na literatura.

### 5.2. Parâmetros físico-químicos quantificados nas águas dos aquírios

A Tabela 4 apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos para padrões de qualidade de água legislados pela Resolução Conama 357/2005 para rios de Classe 2 e Classe 3, que foram empregados para fins de avaliação das condições em que os espécimes foram mantidos durante os experimentos de exposição.

**Tabela 4.** Parâmetros legislados pela Resolução Conama 357/2005 com valores preconizados para rios de Classe 2 e Classe 3.

Resolução Conama 357/2005	Classe 2	Classe 3
<b>pH</b>	6,0 ≤ pH ≤ 9,0	6,0 ≤ pH ≤ 9,0
<b>OD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	5,0	4,0
<b>Turbidez (NTU)</b>	100	100
<b>Nitrato (mg L<sup>-1</sup> de N)</b>	10	10
<b>Sulfato (mg L<sup>-1</sup>)</b>	250	250
<b>Fosfato (mg L<sup>-1</sup> de P)</b>	0,1	0,15
<b>Amônia (mg L<sup>-1</sup> de N)</b>	3,7 (para pH ≤ 7,5)	13,3 (para pH ≤ 7,5)
	2,0 (para 7,5 ≤ pH ≤ 8,0)	5,6 (para 7,5 ≤ pH ≤ 8,0)
	1,0 (8,0 ≤ pH ≤ 8,5)	2,2 (para 8,0 ≤ pH ≤ 8,5)
	0,5 (para pH ≥ 8,5)	1,0 (para pH ≥ 8,5)

Nas Tabelas 5 e 6 estão ilustrados os resultados do monitoramento dos parâmetros físico-químicos para os experimentos de exposição durante 7 e 14 dias e com 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> (no início e ao fim de cada experimento) na água dos aquários.

**Tabela 5.** Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição.

Aquário	NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		NO <sub>3</sub> <sup>1-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	
	i	F	I	f	i	f	i	f
<b>Experimento de 7 dias - classe 3</b>								
Controle	<0,21	1,8±0,9	13,3±0,3	13,3±0,1	6,0±1,4	7,8±1,2	1,8±0,1	2,2±0,2
Ferro	<0,21	2,5±0,7	9,0±0,6	12,8±0,4	6,3±0,9	8,0±0,8	0,5±0,1	0,2±0,1
Cádmio	<0,21	2,1±0,6	13,4±0,2	13,2±0,1	8,1±0,3	9,6±0,5	1,7±0,1	1,9±0,3
Chumbo	<0,21	1,9±0,8	13,4±0,2	13,1±0,1	8,2±0,5	9,8±0,8	1,6±0,0	1,5±0,5
Cobre	<0,21	1,6±0,3	13,3±0,2	13,5±0,1	7,8±0,3	14,1±4,8	1,7±0,0	2,0±0,2
Mistura*	<0,21	1,3±0,4	13,4±0,1	13,6±0,1	7,3±0,6	8,2±1,2	1,7±0,0	1,7±0,0
<b>Experimento de 14 dias - classe 3</b>								
Controle	<0,21	1,8±1,3	10,3±0,8	13,5±0,2	<5,48	13,2±4,0	1,6±0,1	1,8±0,2
Ferro	<0,21	2,9±1,7	6,7±5,3	15,9±1,7	<5,48	10,7±0,7	1,1±0,4	0,3±0,0
Cádmio	<0,21	2,1±0,7	11,9±0,1	13,6±0,3	<5,48	6,2±0,5	1,6±0,0	1,6±0,1
Chumbo	<0,21	2,2±0,8	10,6±0,5	13,9±0,3	<5,48	<5,48	1,6±0,1	1,5±0,1
Cobre	<0,21	2,1±0,9	10,1±0,8	13,0±0,1	<5,48	7,9±1,2	1,6±0,0	3,3±0,8
Mistura*	<0,21	1,8±0,8	12,2±0,2	13,1±0,2	<5,48	7,4±0,6	1,6±0,0	3,2±0,2
<b>Experimento com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA - classe 3</b>								
Controle	<0,21	2,7±2,1	16,3±0,1	17,6±0,2	<5,48	<5,48	1,4±0,1	2,3±0,3
Controle SH	<0,21	2,5±0,5	17,8±0,7	17,5±0,1	<5,48	<5,48	1,3±0,1	2,7±0,4
Ferro	<0,21	3,8±4,0	11,4±0,9	16,6±0,7	<5,48	<5,48	<0,05	1,0±0,7
Cádmio	<0,21	3,4±1,9	17,0±1,3	17,7±0,1	<5,48	<5,48	0,9±0,1	2,5±0,3
Chumbo	<0,21	2,6±2,0	16,2±0,3	17,8±0,2	<5,48	<5,48	1,0±0,2	2,4±0,5
Cobre	<0,21	1,8±0,8	16,1±0,1	17,6±0,1	<5,48	<5,48	1,1±0,1	2,3±0,1
Mistura*	<0,21	1,4±0,8	11,6±0,4	17,3±0,1	<5,48	15,7±3,2	<0,05	0,2±0,1
<b>Experimento com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA - classe 3</b>								
Controle	<0,21	0,5±0,3	16,7±0,1	17,1±0,6	<5,48	<5,48	2,1±0,7	3,0±0,5
Controle SH	<0,21	<0,21	16,9±0,1	17,3±0,1	<5,48	<5,48	1,7±0,0	2,8±0,3
Ferro	<0,21	<0,21	10,8±0,2	16,5±0,4	<5,48	<5,48	1,0±0,2	0,8±0,2
Cádmio	<0,21	0,3±0,2	17,3±0,1	17,0±0,2	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,1±0,2
Chumbo	<0,21	0,5±0,1	17,4±0,2	17,0±0,1	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,2±0,1
Cobre	<0,21	0,3±0,1	17,3±0,1	17,1±0,2	<5,48	<5,48	1,7±0,0	3,2±0,1
Mistura*	<0,21	0,7±0,3	11,6±0,12	15,8±0,4	<5,48	<5,48	<0,05	0,8±0,3
<b>Experimento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA - classe 3</b>								
Controle	<0,21	3,4±0,8	17,7±0,4	16,9±0,3	<5,48	<5,48	1,6±0,0	3,0±0,5
Controle SH	<0,21	3,2±0,9	18,4±0,5	16,7±0,3	<5,48	8,1±1,6	1,7±0,0	2,5±0,3
Ferro	<0,21	3,7±1,8	24,6±1,2	16,7±0,2	<5,48	6,0±1,7	0,1±0,0	0,8±0,5
Cádmio	<0,21	3,0±1,7	18,3±0,2	17,0±0,4	<5,48	7,3±1,1	1,6±0,0	2,9±0,5
Chumbo	<0,21	3,6±1,8	18,6±0,2	17,2±0,5	<5,48	7,7±1,3	1,9±0,5	2,6±0,4
Cobre	<0,21	3,9±1,3	21,0±3,8	16,9±0,3	<5,48	8,6±0,7	1,7±0,0	3,0±0,2
Mistura*	<0,21	3,1±1,2	24,4±0,3	16,7±0,4	<5,48	6,0±1,9	0,2±0,0	1,0±0,3
<b>Experimento com águas do Rio Preto</b>								
Rio Preto	<0,21	2,4±0,6	12,7±0,1	8,9±0,4	<5,48	5,8±1,4	0,7±0,0	1,6±0,5

\*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

**Tabela 6.** Parâmetros físico-químicos analisados na água dos aquários no início (i) e fim (f) dos experimentos de exposição.

Aquário	Temperatura (°C)		pH		Turbidez (NTU)		TOC (mg L <sup>-1</sup> )		OD (mg L <sup>-1</sup> )	
	I	F	i	f	i	f	i	f	i	f
<b>Experimento de 7 dias</b>										
<b>Controle</b>	23,9±0,5	27,0±0,2	6,6±0,3	6,8±0,2	1,5±1,5	1,2±0,2	0,6±0,2	2,0±0,5	6,0±0,8	4,4±0,2
<b>Ferro</b>	24,1±0,1	26,6±0,1	6,0±0,2	6,6±0,1	35±7,3	11,0±3,0	0,7±0,2	1,9±0,4	10,6±1,0	4,2±0,2
<b>Cádmio</b>	23,8±0,1	26,3±0,1	6,3±0,2	6,7±0,1	1,0±0,3	2,7±0,9	0,9±0,3	1,4±0,1	10,3±0,6	4,3±0,2
<b>Chumbo</b>	23,9±0,2	26,7±0,5	6,2±0,1	6,7±0,0	1,0±0,4	3,4±0,8	0,8±0,2	2,6±1,4	8,3±0,6	4,8±0,5
<b>Cobre</b>	24,3±0,2	27,2±0,1	6,3±0,0	6,7±0,1	0,6±0,7	2,0±0,6	1,1±0,5	2,0±0,1	11,2±0,4	4,4±0,1
<b>Mistura*</b>	24,7±0,4	26,6±0,3	6,5±0,1	6,7±0,0	0,7±0,3	1,5±0,4	0,6±0,1	2,7±0,3	13,1±0,4	4,4±0,1
<b>Experimento de 14 dias</b>										
<b>Controle</b>	25,3±0,2	26,9±0,2	7,1±0,1	6,7±0,3	0,3±0,3	0,8±0,1	2,0±2,2	1,6±0,3	5,5±0,2	5,6±0,1
<b>Ferro</b>	25,5±0,2	26,6±0,1	7,2±0,1	6,5±0,2	35,0±2,0	6,4±2,1	0,5±0,1	1,2±0,3	5,8±0,3	5,6±0,4
<b>Cádmio</b>	24,6±0,4	26,6±0,2	7,3±0,2	6,7±0,2	1,0±0,8	1,3±0,3	0,4±0,1	1,1±0,2	5,4±0,2	5,7±0,4
<b>Chumbo</b>	25,2±0,2	26,9±0,2	7,0±0,1	6,6±0,2	0,8±0,5	0,8±0,1	0,5±0,4	1,0±0,1	5,5±0,2	5,5±0,8
<b>Cobre</b>	25,3±0,4	26,7±0,1	7,2±0,1	7,0±0,1	1,2±0,5	2,3±0,5	0,4±0,1	1,8±0,4	5,7±0,1	5,7±0,4
<b>Mistura*</b>	24,9±0,4	26,8±0,1	6,9±0,6	7,1±0,1	0,5±0,5	3,6±0,6	1,4±1,6	2,6±0,3	5,5±0,3	5,7±0,4
<b>Experimento com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA</b>										
<b>Controle</b>	27,2±0,0	23,5±0,3	7,4±0,2	8,5±0,2	0,4±0,2	1,0±0,5	1,2±0,6	1,0±0,6	5,3±0,2	5,4±0,3
<b>Controle SH</b>	27,1±0,1	23,2±0,1	7,7±0,1	8,3±0,2	0,8±0,6	1,1±0,7	0,5±0,2	1,6±1,5	5,4±0,2	5,3±0,5
<b>Ferro</b>	26,8±0,0	23,4±0,1	6,9±0,0	8,2±0,1	29,2±1,3	4,5±1,4	1,6±0,5	1,4±0,9	4,9±0,2	6,4±0,3
<b>Cádmio</b>	26,8±0,1	23,6±0,0	7,6±0,3	8,4±0,2	0,1±0,1	0,2±0,2	2,0±1,0	1,0±0,5	5,7±0,3	7,0±0,4
<b>Chumbo</b>	26,8±0,1	23,6±0,0	7,7±0,3	8,3±0,1	0,4±0,2	1,3±0,3	1,9±1,1	0,6±0,1	5,6±0,6	6,3±0,5
<b>Cobre</b>	26,7±0,1	23,5±0,0	7,1±0,1	8,2±0,1	1,1±0,7	0,6±0,5	1,6±0,2	0,7±0,1	5,1±0,2	6,5±0,1
<b>Mistura*</b>	26,9±0,1	24,3±1,1	7,5±0,1	8,3±0,1	14,3±1,9	2,3±0,8	2,3±1,1	2,1±1,9	5,6±0,1	7,1±0,1
<b>Experimento com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA</b>										
<b>Controle</b>	27,2±0,0	24,6±0,1	7,4±0,2	8,0±0,0	0,0±0,0	0,8±0,3	1,6±1,0	0,7±0,2	7,5±1,2	6,4±0,1
<b>Controle SH</b>	27,1±0,1	24,2±0,0	7,7±0,1	8,0±0,0	0,0±0,0	1,5±0,5	0,7±0,3	1,1±0,3	6,6±0,2	6,5±0,2
<b>Ferro</b>	26,8±0,0	24,3±0,1	6,9±0,0	7,9±0,0	14,5±3,4	4,4±0,8	1,6±0,6	1,1±0,7	7,1±0,1	6,9±0,1
<b>Cádmio</b>	26,8±0,1	24,4±0,1	7,1±0,1	8,0±0,0	0,0±0,0	1,0±0,6	1,0±0,5	5,6±4,1	8,1±0,1	6,6±0,3
<b>Chumbo</b>	26,8±0,1	24,5±0,1	7,7±0,3	8,0±0,0	0,0±0,1	2,6±1,0	0,3±0,2	0,8±0,2	7,7±0,2	6,9±0,1
<b>Cobre</b>	26,7±0,1	24,4±0,0	7,1±0,1	7,9±0,0	0,1±0,1	1,1±0,4	0,6±0,3	2,6±2,0	7,5±0,2	6,6±0,3
<b>Mistura*</b>	26,9±0,1	24,4±0,0	7,5±0,1	7,9±0,0	11,8±0,7	2,6±0,4	1,0±0,6	6,3±0,9	7,8±0,2	6,8±0,1
<b>Experimento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA</b>										
<b>Controle</b>	24,8±0,2	25,7±0,1	7,2±0,1	8,1±0,1	0,4±0,2	0,6±0,5	2,0±1,3	1,2±0,1	6,7±0,4	6,6±0,2
<b>Controle SH</b>	24,5±0,1	25,4±0,0	6,7±0,2	8,0±0,0	0,3±0,1	1,1±0,4	6,1±2,8	16,0±0,8	6,7±0,2	6,7±0,2
<b>Ferro</b>	24,0±0,1	24,9±0,6	7,2±0,0	7,9±0,0	19,9±0,7	2,4±0,4	2,8±1,6	22,1±3,3	6,8±0,1	6,6±0,2
<b>Cádmio</b>	23,8±0,0	25,3±0,0	7,4±0,1	8,0±0,0	0,3±0,3	1,3±0,7	2,6±0,3	40,1±8,8	6,9±0,1	6,7±0,1
<b>Chumbo</b>	23,8±0,0	25,3±0,1	7,5±0,0	8,0±0,0	0,8±0,3	0,8±0,2	2,5±0,3	25,8±3,4	7,3±0,2	6,8±0,2
<b>Cobre</b>	24,2±0,3	25,3±0,0	7,2±0,0	7,9±0,2	0,4±0,3	0,2±0,3	4,3±0,6	21,9±3,3	7,1±0,1	6,9±0,1
<b>Mistura*</b>	23,9±0,0	25,1±0,1	7,2±0,1	7,9±0,0	12,8±2,8	1,8±0,7	4,1±0,3	36,6±5,4	6,7±0,1	6,6±0,1
<b>Experimento com águas do Rio Preto</b>										
<b>Rio Preto</b>	24,0±0,0	25,1±0,0	7,3±0,2	8,1±0,4	4,9±1,0	1,1±0,4	2,2±0,1	3,3±0,4	6,6±0,2	6,5±0,1

\*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

Para o experimento de exposição durante 7 dias foi possível observar que, no início obteve-se baixos níveis de amônia e nitrato bem próximos ao recomendado pela Resolução Conama 357/2005). De acordo com Kubitzka (1999), valores de amônia acima de 0,20 mg/L são suficientes para induzir toxicidade crônica e levar à diminuição do crescimento e da tolerância dos peixes a doenças (Pereira e Mercante, 2005). Por outro lado, Karasu Benli e Köksal (2005) afirmaram que a concentração letal (48 horas) de amônia para tilápias é de 7,4 mg L<sup>-1</sup>. O aumento na concentração de amônia no decorrer dos experimentos se dá devido ao aumento de biomassa fornecida, como por exemplo, o alimento ministrado (PEREIRA E MERCANTE, 2005). As concentrações de sulfato monitoradas no experimento de exposição durante 7 dias foram inferiores ao valor recomendado pela Resolução Conama 357/05.

Para o experimento de exposição durante 14 dias, o pH no início e ao fim do experimento se manteve dentro da faixa recomendada (Tabelas 4 e 6). A Temperatura se manteve entre 25,1±0,3°C, assegurando boas condições de sobrevivência para os peixes. Assim, os parâmetros como pH, Temperatura, OD não diferiram consideravelmente dos valores quantificados para o experimento de 7 dias. Isso pode ser justificado pela troca de água no período intermediário do experimento, que é necessária para assegurar uma boa qualidade da água para a sobrevivência das tilápias. As taxas de OD foram superiores aos valores recomendados de no mínimo 5 mg L<sup>-1</sup> sendo a taxa de oxigenação no ambiente regulada durante todo o experimento. Conforme observado na Tabela 6, comparando com os valores da Resolução Conama 357/2005 para rios Classe 2 (Tabela 4), os valores de turbidez foram inferiores aos recomendados. Obtiveram-se níveis de amônia menores que o LD no início do experimento, porém ao final a concentração de NH<sub>3</sub> elevou-se consideravelmente, após a troca de água com retirada de excretas essa taxa diminui. As concentrações de sulfato mantiveram-se bem abaixo dos valores recomendados pela Resolução Conama 357/2005 (Tabela 4). Como podemos observar na Tabela 5 a concentração de fosfato encontrada excedeu a concentração recomendada pela Resolução Conama 357/2005 para fosfato (Tabela 4). Tal fato pode ter ocorrido devido ao incremento de ração e liberação de excretas.

De maneira geral, as concentrações de amônia, nitrato, sulfato e fosfato tenderam a aumentar ao passar do tempo de exposição na água dos aquários. Esse comportamento era esperado uma vez que, a alimentação dos peixes a cada 3,5 dias e acúmulo das excretas nos aquários contribui para o aumento desses além da condutividade e turbidez. Verifica-se pelas Tabelas 5 e 6 que amônia, sulfato, dentre outros parâmetros tiveram sua produção diminuída nos experimentos na presença de SHA em comparação àqueles conduzidos na ausência de tais substâncias.

Destaca-se a importância de considerar as análises químicas das soluções empregadas durante os experimentos, pois desencadeiam alterações bioquímicas nos organismos que podem ser confundidas com o efeito dos contaminantes. Nesse sentido, tais autoras atentam para a fundamental importância de controlar a quantidade de alimento fornecida para a manutenção da qualidade da água de um sistema de criação como os experimentos.

Para o tempo de exposição de 7 dias, comparando os valores obtidos para os parâmetros pH e Temperatura na água dos aquários utilizados durante os experimentos de exposição com os valores preconizados na Resolução Conama 357/2005 para rios Classe 2, o pH se manteve dentro da faixa recomendada. A Temperatura se manteve entre  $24,1 \pm 0,3$  °C, assegurando boas condições de sobrevivência para os organismos. Os valores de turbidez não ultrapassaram o recomendado para rios Classe 2. As taxas de OD foram superiores aos valores recomendados de no mínimo 5 mg/L para o início do experimento mas no final se encontrou 0,88 vezes menor que o recomendado.

### **5.3. Determinação de metais nas amostras de águas dos aquários**

Valores obtidos na quantificação dos metais na água dos aquários utilizados para exposição no início e ao final dos bioensaios estão mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores obtidos na quantificação dos metais totais nas águas dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição em função da concentração de metais.

Resolução Conama 357/05	CLASSE 2		CLASSE 3		5 x CLASSE 3	
	I	f	I	f	i	F
<b>Cu</b>	<b>9 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>13 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>65 µg L<sup>-1</sup></b>	
<b>Controle</b>	3,8±1,3	3,6±0,6	2,2±0,1	1,9±0,4	0,8±0,1	2,1±0,2
<b>Cobre</b>	4,3±0,9	3,6±0,5	11,0±2,0	10,0±3,0	83,0±40,0	103,0±60,0
<b>Mistura*</b>	5,7±0,9	4,5±0,9	12,0±2,6	8,1±1,7	97,6±35,4	22,6±10,8
<b>Cd</b>	<b>1,0 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>50 µg L<sup>-1</sup></b>	
<b>Controle</b>	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
<b>Cádmio</b>	1,4±0,3	1,5±0,2	14,5±5,0	12,0±1,0	75,0±2,0	65,0±7,0
<b>Mistura*</b>	1,4±0,5	0,8±0,3	16,5±0,3	11,0±0,5	84,8±4,0	19,8±2,4
<b>Pb</b>	<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>33 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>165 µg L<sup>-1</sup></b>	
<b>Controle</b>	1,6±0,2	2,4±0,1	1,9±0,3	3,7±0,3	1,8±0,1	2,9±0,2
<b>Chumbo</b>	19,0±2,0	8,0±2,0	35,1±0,4	23,0±8,0	240,0±10,0	210,0±10,0
<b>Mistura*</b>	16,0±1,8	5,8±0,9	39,9±1,3	24,7±1,1	300,0±10,0	60,0±10,0
<b>Fe</b>	<b>0,3 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>5,0 mg L<sup>-1</sup></b>		<b>25 mg L<sup>-1</sup></b>	
<b>Controle</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Ferro</b>	0,45±0,09	0,12±0,06	5,4±0,4	4,0±0,5	24±4	6±5
<b>Mistura*</b>	0,43±0,05	0,13±0,02	3,3±1,4	3,8±0,2	9,6±7,9	3,5±1,3

\*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

De modo geral, a água dos aquários Controle mantida durante os experimentos apresentou concentrações inferiores ao limite de detecção, com exceção dos metais Cu e Pb, quando comparado aos aquários que receberam adição de metais. Com exceção do Cobre, as concentrações dos metais tenderam a diminuir ao fim dos experimentos, sugerindo que os peixes absorveram parte do metal contido na água. As quantificações dos padrões de controle e do material de referência certificado (SRM 1640a) estiveram dentro dos 5% de desvio.

Valores obtidos na quantificação dos metais na água dos aquários utilizados para exposição no início e ao final dos bioensaios na presença de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA estão mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores obtidos na quantificação dos metais totais nas amostras de água dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição na presença de diferentes concentrações de SHA.

Resolução Conama 357/05	0,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		1,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		5,0 mg L <sup>-1</sup> SHA	
	I	f	I	f	i	F
<b>Cu</b>	<b>13 µg L<sup>-1</sup></b>					
<b>Controle</b>	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38
<b>Controle SH</b>	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38
<b>Cobre total</b>	10,1±0,4	5,5±1,5	10,4±0,7	4,8±0,8	13,6±1,4	3,5±1,2
<b>Mistura*</b>	9,5±0,8	1,9±0,7	9,3±0,3	4,1±0,5	13,1±0,3	3,1±0,7
<b>Cd</b>	<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>					
<b>Controle</b>	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0	0,7±0,1	0,7±0,0
<b>Controle SH</b>	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,1	0,1±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
<b>Cádmio</b>	11,3±0,1	7,2±1,2	9,3±0,3	4,0±0,7	14,2±0,3	7,2±1,3
<b>Mistura*</b>	12,1±0,2	1,9±0,2	9,0±0,6	2,1±0,4	12,5±0,2	2,3±0,3
<b>Pb</b>	<b>33 µg L<sup>-1</sup></b>					
<b>Controle</b>	<0,56	<0,56	1,9±0,8	<0,56	1,0±0,7	<0,56
<b>Controle SH</b>	<0,56	<0,56	0,8±0,3	<0,56	<0,56	<0,56
<b>Chumbo</b>	34,5±2,9	4,9±1,9	33,0±1,2	8,9±3,5	37,4±6,2	5,5±1,7
<b>Mistura*</b>	30,8±1,0	2,3±1,4	31,2±0,7	4,4±1,5	28,8±0,6	2,5±1,1
<b>Fe</b>	<b>5,0 mg L<sup>-1</sup></b>					
<b>Controle</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Controle SH</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Ferro</b>	4,9±0,1	0,6±0,2	3,9±0,2	0,4±0,2	4,7±0,1	0,4±0,1
<b>Mistura*</b>	4,7±0,2	0,4±0,2	4,2±0,2	0,3±0,1	4,2±0,1	0,2±0,1

\*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

Os valores obtidos na quantificação dos metais na água dos aquários utilizados para exposição às águas do rio Preto no início e ao final dos experimentos estão mostrados na Tabela 9, e os valores obtidos na quantificação dos metais na água dos aquários utilizados para exposição nos experimentos na presença de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA e submetidas à passagem no SUFT estão mostrados na Tabela 10. Entende-se por Cu, Cd, Pb e Fe “livre” a concentração de metal biodisponível nas amostras de água dos aquários coletadas ao fim dos experimentos, ou seja, não complexado as SHA.



**Tabela 9.** Valores obtidos na quantificação dos metais totais e “livres” nas amostras de água dos aquários no início (i) e ao fim (f) dos experimentos de exposição, para águas do rio Preto na proporção 1:1 (v/v).

Metais	Rio Preto			
	Cobre	Cádmio	Chumbo	Ferro
<b>Total</b>	<1,38	0,82±0,01	<0,56	0,37±0,02
<b>“livre”</b>	<1,38	0,58±0,03	<0,56	<0,01

De maneira geral, a concentração de metal livre não complexado as SHA foi menor em relação à concentração de metal total na água dos aquários utilizados durante os experimentos, ou seja, parte dos metais encontrava-se complexado às SHA. Assim, observou-se tais substâncias complexam até 70% dos metais presentes, o que diminui sua disponibilidade a biota.

**Tabela 10.** Valores obtidos para metal “livre” e complexado nas amostras dos aquários dos experimentos de exposição na presença de SHA.

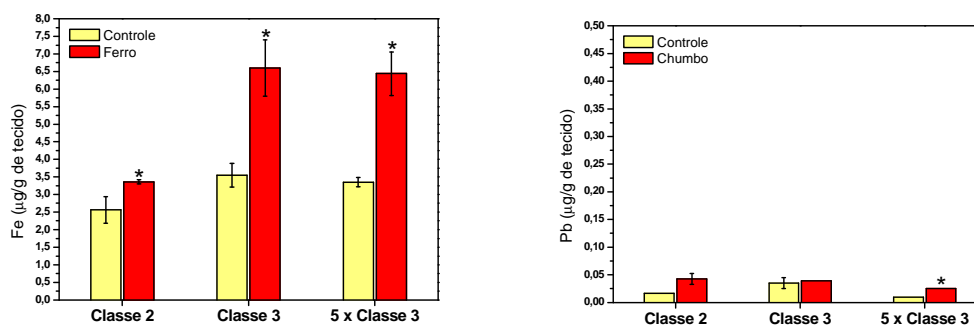
Resolução Conama 357/05	0,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		1,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		5,0 mg L <sup>-1</sup> SHA	
	Livre	Complexado	“livre”	Complexado	“livre”	Complexado
<b>Cu</b>	<b>13 µg L<sup>-1</sup></b>					
Controle	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38
Controle SHA	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38	<1,38
Cobre	5,2±0,8	4,9±0,4	-	-	7,3±0,7	6,3±0,7
Mistura*	2,9±0,7	6,6±0,2	-	-	2,9±0,6	10,2±0,3
<b>Cd</b>	<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>					
Controle	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Controle SHA	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,5±0,1	0,1±0,0
Cádmio	4,3±0,6	7,0±0,4	-	-	4,7±0,7	9,5±0,3
Mistura*	1,0±0,1	11,1±0,2	-	-	1,5±0,3	11,0±0,2
<b>Pb</b>	<b>33 µg L<sup>-1</sup></b>					
Controle	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56
Controle SHA	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56	<0,56
Chumbo	6,9±2,6	27,6±2,0	-	-	-	-
Mistura*	-	-	-	-	-	-
<b>Fe</b>	<b>5,0 mg L<sup>-1</sup></b>					
Controle	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Controle SHA	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ferro	0,3±0,1	4,6±0,1	0,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	4,6±0,1
Mistura*	0,2±0,1	4,5±0,1	-	-	0,1±0,0	4,1±0,1

\*Aquário contendo todos os metais (Fe, Cd, Pb e Cu)

- Não quantificado

#### 5.4. Determinação de metais no tecido muscular dos peixes

Na Figura 7 está ilustrada a variação da concentração de metal acumulado no tecido em função da exposição a concentrações crescentes dos metais Fe e Pb, referentes a Resolução Conama 357/05.

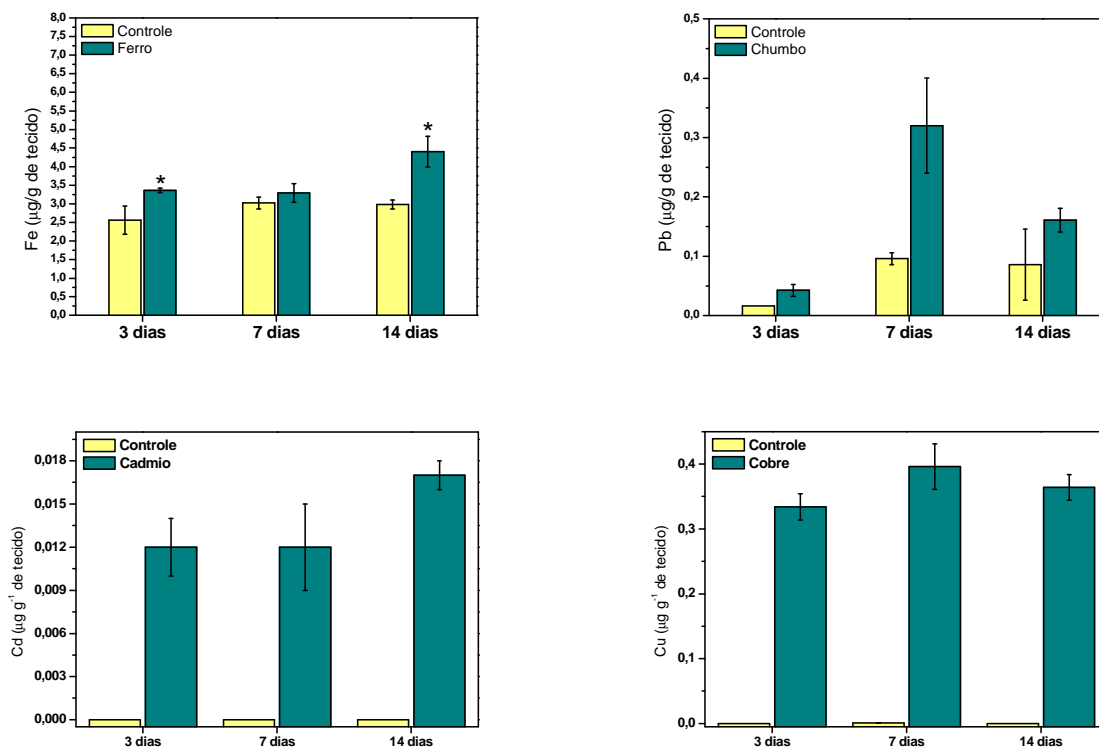


**Figura 7.** Concentrações de Fe e Pb no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas às concentrações referentes à Resolução Conama 357/05 para rios classe 2, classe 3 e uma concentração 5 vezes maior que a classe 3. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle.

Os resultados mostraram que a exposição a metais, de maneira geral, leva ao aumento da concentração de metal total nos tecidos musculares. A concentração de Fe e Pb no tecido muscular das tilápias expostas a esses metais foi algumas vezes maior que a concentração correspondente dos peixes mantidos como grupo controle, ou seja, sem adição de metal (1,3; 1,9 e 2,1 vezes para exposição a Fe e 2,6; 3,2 e 2,6 vezes para exposição a Pb, ambos para exposição a concentrações referentes à classe 2, classe 3 e 5 vezes classe 3, respectivamente).

Geralmente, a incorporação de metais em organismos aquáticos é proporcional ao grau de contaminação do meio. Tal comportamento foi observado para exposição a Fe, já para Pb não ocorreu níveis de concentração crescente. A bioacumulação de Pb por peixes leva algumas semanas para alcançar um equilíbrio e tal efeito ocorre principalmente nas brânquias, fígado, rins e ossos, mas não no músculo (Cavalcante, 2009). A bioacumulação de Fe aumentou diretamente proporcional ao incremento do metal no ambiente, comportamento contrário ao observado para exposição a Pb.

Na Figura 8 estão mostradas as concentrações de Cd, Cu, Fe e Pb bioacumulado no músculo de peixes expostos durante 3, 7 e 14 dias.



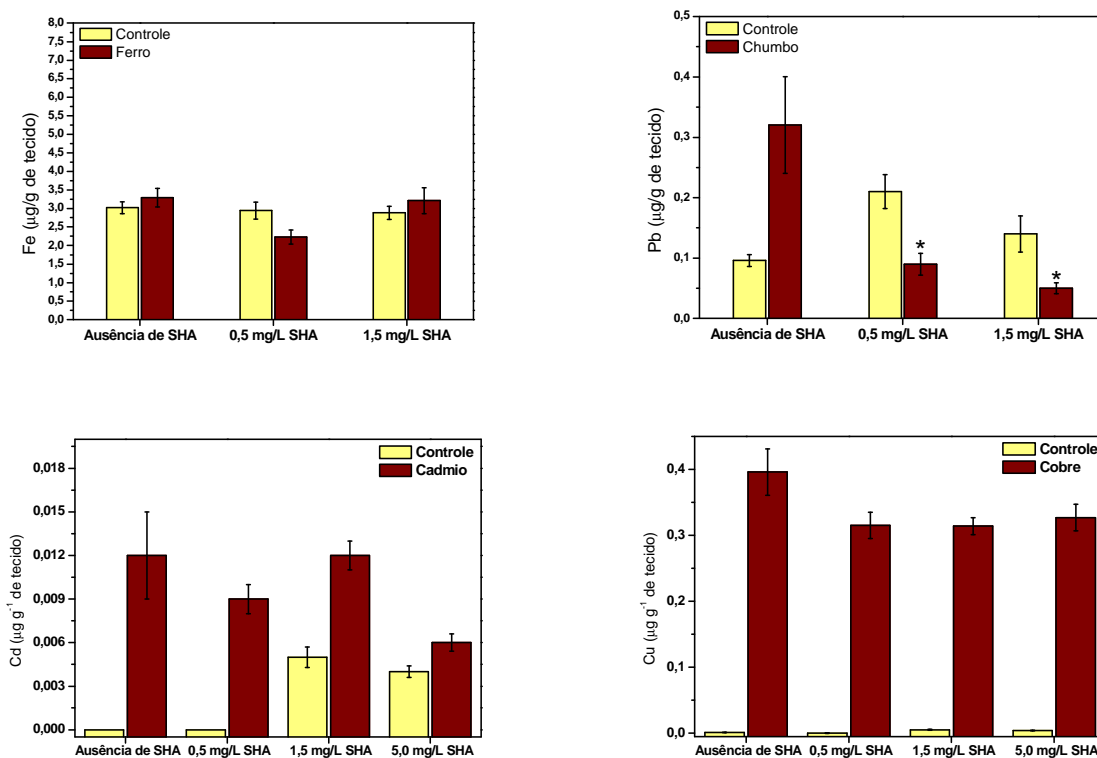
**Figura 8.** Concentrações de Fe, Pb, Cd e Cu no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas durante 3, 7 e 14 dias. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle.

Os resultados (Figura 8) indicaram que a absorção de Fe pelas tilápias aumenta de acordo com o tempo de exposição (1,3, 1,3 e 1,5 vezes maior que o controle, para 3, 7 e 14 dias respectivamente), porém esses níveis não são muito elevados quando comparados ao grupo controle, o que pode ser justificado pelo fato do Fe ser um metal essencial, necessário para funções fisiológicas dos peixes. Comportamento semelhante foi observado para o Cd, sendo que as concentrações do metal no tecido muscular dos peixes mantidos como grupo Controle foram menores que os valores obtidos do limite de detecção do método.

O Chumbo apresentou comportamento distinto do Ferro, já que a maior acumulação no tecido muscular ocorreu no período de 7 dias (1,2, 3,3 e 2,0 vezes maior do que o grupo controle, para 3, 7 e 14 dias), sugerindo que no músculo, o tempo não é fator que influencia proporcionalmente a contaminação para o Pb, ou esse metal pode ter sido acumulado em outros tecidos, por outras vias. Comportamento semelhante foi observado para o Cu, sendo que as concentrações do metal no tecido muscular dos peixes mantidos como grupo Controle foram menores que o limite de detecção do método.

Comparando a acumulação de Fe e Pb nos três diferentes tempos de exposição, observou-se que para o Fe a bioacumulação é diretamente proporcional ao tempo e concentração de exposição. O comportamento observado para o metal Pb mostrou uma relação diferente, com a maior acumulação para o período de 7 dias. Segundo Cavalcante (2009), o Pb geralmente é incorporado por peixes proporcionalmente ao incremento do metal no ambiente, porém a assimilação deste alcança um equilíbrio após um tempo de exposição. Dessa forma os resultados obtidos sugeriram que o tempo de 7 dias é o período que a acumulação do Pb no tecido muscular é mais elevada, o que pode indicar que para o tempo de 14 dias o peixe não assimila grande quantidade deste metal pela via do tecido muscular.

Os resultados dos experimentos de exposição a concentrações de Fe, Pb, Cd e Cu preconizadas pela Resolução Conama 357/2005 para rios Classe 3 durante 7 dias na ausência e na presença de SHA (0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) avaliaram a influência dessas substâncias na biodisponibilidade desses metais por meio da concentração nos tecidos, e podem ser observados na Figura 9.



**Figura 9.** Concentrações de Fe, Pb, Cd e Cu no tecido muscular de tilápias do grupo controle e tilápias expostas a esses metais na presença e ausência de SHA. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle.

A presença de SHA influenciou o acúmulo de Pb no tecido muscular das Tilápias. Quanto maior a concentração de SHA no meio, menores foram as concentrações de Pb no músculo, sendo essas menores, inclusive, que os respectivos grupos Controle de cada experimento (0,25 e 0,17 vezes para 0,5 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA, respectivamente). É possível afirmar que a interação do metal Pb com as SHA tornou-o menos tóxico e menos disponível para ser absorvido pelos organismos. Para exposição a Fe, como já esperado não foi observado bioacumulação e, conseqüentemente não há efeito da presença de diferentes concentrações de SHA.

Foi observado maior acúmulo de Cu no tecido muscular dos peixes expostos ao metal na ausência de SHA em relação aos experimentos mantidos na presença de SHA, sendo que as concentrações do metal no tecido muscular dos peixes mantidos como grupo Controle foram menores que o limite de detecção do método. Os experimentos de exposição ao Cd seguiu o mesmo comportamento, onde na ausência de SHA houve maior acúmulo do metal quando comparado com os experimentos mantidos na presença de SHA.

### 5.5. Bioacumulação de Fe, Pb, Cu e Cd no tecido muscular de tilápias

Na Tabela 11 estão mostrados os valores de bioacumulação de Fe, Pb, Cu e Cd para todos os experimentos realizados, onde se verifica que a maior bioacumulação ocorreu para os metais na ausência de substâncias húmicas, exceto para o Cu, o que confirma a hipótese de que as mesmas diminuem a disponibilidade destes para bioacumular nos organismos aquáticos. As maiores bioacumulações para Fe, Pb e Cu ocorreram para o experimento mantido por 7 dias para a concentração recomendada pela Resolução Conama 357/2005 para rios classe 3, bem como para o experimento realizado com amostras de água de represa para Fe e Pb. Para o Cd a maior bioacumulação foi observada para 3 dias rios classe 3.

**Tabela 11.** Fator de bioacumulação no tecido muscular dos metais Fe, Pb, Cu e Cd para os experimentos de exposição.

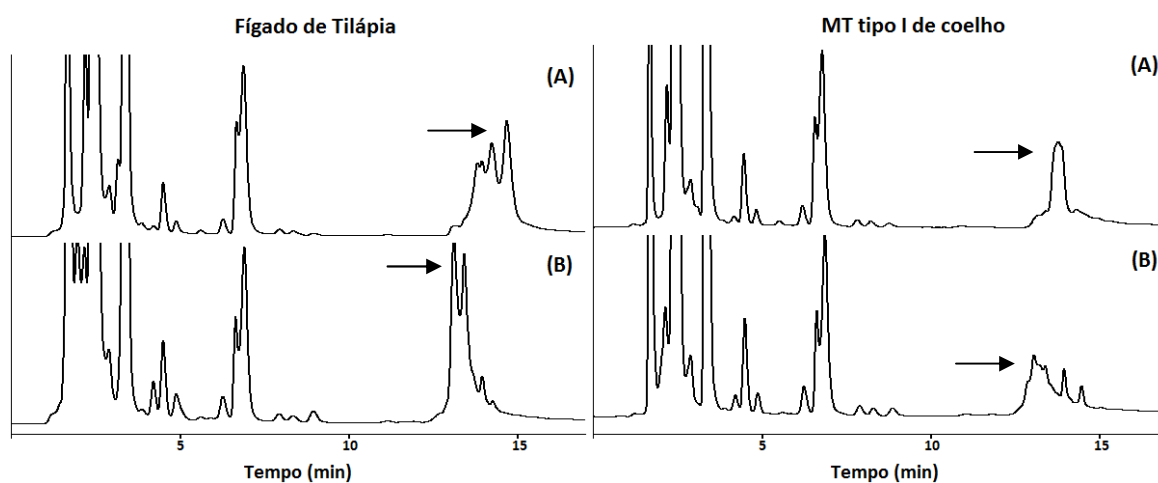
Fator de Bioacumulação	Fe (L kg <sup>-1</sup> )	Pb (L kg <sup>-1</sup> )	Cu (L kg <sup>-1</sup> )	Cd (L kg <sup>-1</sup> )
Classe 2 (3 dias)	7,8±1,5	2,2±1,8	-	-
Classe 3 (3 dias)	1,3±0,7	1,1±0,5	31,9±9,0	8,5±0,5
5xClasse 3 (3 dias)	0,3±0,1	0,1±0,0	-	-
Classe 3 (7 dias)	8,8±5,4	23,0±35,0	42,9±0,5	1,1±0,1
Classe 3 (14 dias)	4,5±4,4	8,2±4,8	30,0±1,7	1,4±0,3
Classe 3 - 0,5 mg L <sup>-1</sup> de SHA (7 dias)	0,5±0,1	3,0±1,9	31,0±10,0	0,7±0,3
Classe 3 - 1,5 mg L <sup>-1</sup> de SHA (7 dias)	0,8±0,3	1,5±0,9	30,1±9,2	1,3±0,6
Classe 3 - 5,0 mg L <sup>-1</sup> de SHA (7 dias)	-	-	24,0±4,4	0,3±0,2
Água do rio Preto (7 dias)	6,1±1,8	90,0±129,0	-	-

- não calculado

## 5.6. Metalotioneínas como biomarcadores ambientais

### 5.6.1. Adaptação do método para quantificação de metalotioneínas

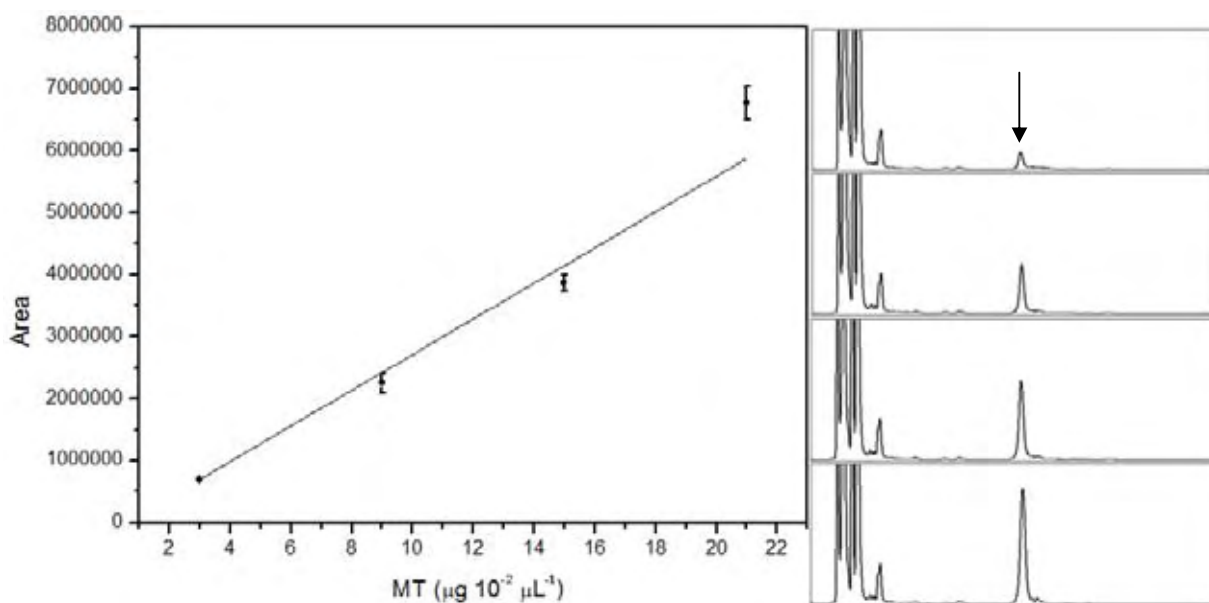
O método de quantificação de metalotioneínas se mostrou bem sucedido depois de uma série de testes realizados em laboratório. A Figura 10 mostra o efeito da concentração dos reagentes SDS, DTT e mBBr na rotulagem de MT de fígado de coelho e tilápia. Para MT tipo I de coelho, as concentrações ótimas de DTT, SDS e mBBr foram 20, 10 e 12  $\mu\text{L}$ , respectivamente, enquanto para MT de tilápia foram 10, 4 e 7  $\mu\text{L}$ . O excesso de grupos tióis oriundos do DTT pode diminuir a ligação do mBBr com os mesmos grupos presentes nas MT, assim como a alta pureza do SDS é importante para a boa definição do pico e seu tempo de retenção (Romero-Ruiz et al., 2008).



**Figura 10.** Separação de MT de fígado de tilápia por HPLC-FD usando 20, 10 e 12  $\mu\text{L}$  (A) e 10, 4 e 7  $\mu\text{L}$  (B) de DTT, SDS e mBBr, respectivamente. As setas indicam o pico referente à MT.

A Figura 11 ilustra a curva analítica obtida para a área dos picos obtidos por HPLC-FD vs concentração de padrões de metalotioneína de coelho Tipo I.

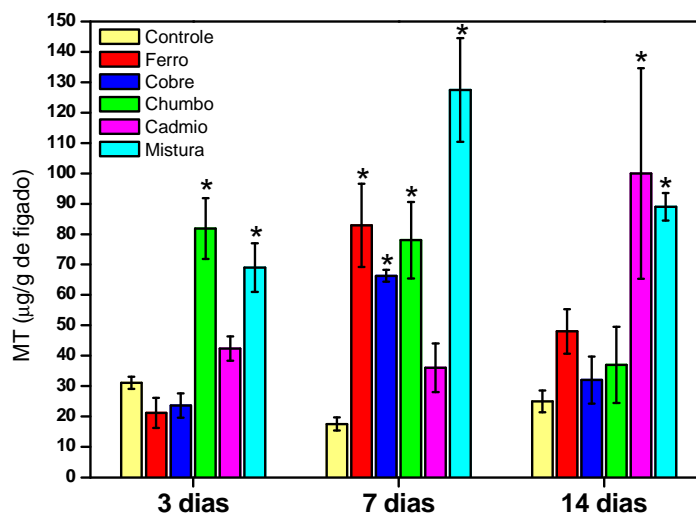




**Figura 11.** Curva analítica típica utilizada na quantificação de metalotioneínas. No detalhe, cromatogramas gerados a partir das injeções de concentrações crescentes de metalotioneína tipo I de coelho, nos quais a seta indica o pico referente à MT. O limite de detecção foi de  $0,02 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ .

### 5.6.2. Avaliação do tempo de resposta e da concentração de contaminante na indução de Metalotioneínas

Foi avaliada a influência do tempo de duração dos ensaios na indução de Metalotioneínas em peixes expostos a metais isolados (Cádmio, Cobre, Chumbo e Ferro) bem como a mistura desses contaminantes durante 3, 7 e 14 dias conforme mostrado na Figura 12.



**Figura 12.** Conteúdo de MT no fígado de tilápias expostas a Ferro, Cádmiio, Chumbo, Cobre, Mistura desses metais e do Controle mantidos expostos durante 3, 7 e 14 dias. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle.

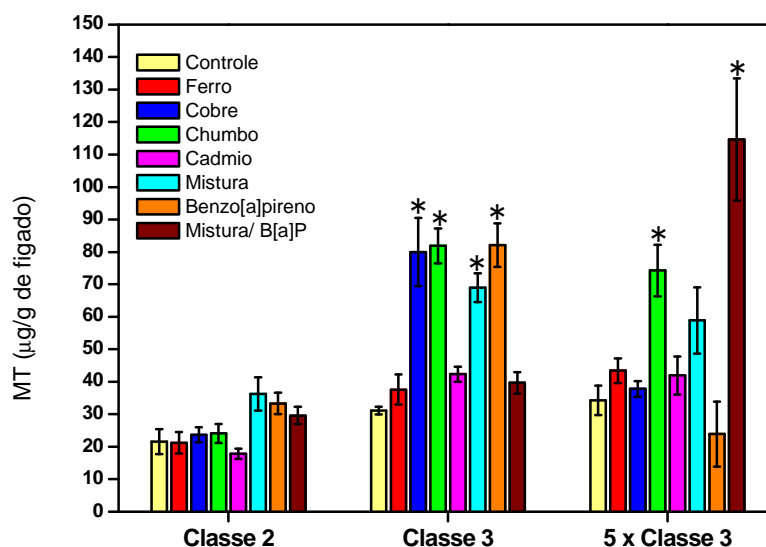
Em relação à influência do tempo de exposição na resposta, observou-se que a indução das MT para peixes expostos durante 3 dias ( $21 \pm 5$ ,  $42 \pm 4$ ,  $82 \pm 10$ ,  $24 \pm 4$  e  $69 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$  de fígado para Fe, Cd, Pb, Cu e Mistura, respectivamente), foi menor quando comparada a exposição durante 7 dias ( $83 \pm 19$ ,  $36 \pm 13$ ,  $78 \pm 20$ ,  $66 \pm 3$  e  $127 \pm 32 \mu\text{g mg}^{-1}$  de fígado), e 14 dias ( $48 \pm 13$ ,  $100 \pm 60$ ,  $37 \pm 23$ ,  $32 \pm 15$  e  $89 \pm 8 \mu\text{g mg}^{-1}$  de fígado), exceto para o íon Pb. De maneira geral, o experimento realizado por 7 dias apresentou valores de indução de MT pouco maiores que o ensaio por 14 dias, para a maioria dos metais. Assim, considerando os resultados observados, conclui-se que a quantificação de metalotioneínas em tilápias, quando utilizada como ferramenta de investigação de poluição aquática pelos metais estudados durante um período de 7 dias de exposição é satisfatória para obtenção de resultados positivos para MT como biomarcador ambientais (4,71; 2,05; 4,44; 3,77 e 7,25 vezes maior que o Controle para Fe, Cd, Pb, Cu e M, respectivamente). Wu e colaboradores (2007) expuseram tilápias a cádmio e observaram

aumento da indução das MT em relação ao grupo controle, porém não houve diferença dos resultados para os experimentos mantidos durante 5 e 15 dias.

Em estudos realizados com peixes de água salgada foi observado que houve indução significativa nos níveis de metalotioneínas em 48 horas de exposição (JEBALI et al., 2006). Man e Woo (2008) também observaram o aumento na indução de metalotioneínas em resposta à exposição de peixes marinhos à Cd por 96 horas. Por outro lado, experimentos utilizando tilápias mostraram que há um incremento nos níveis da proteína após exposição por 14 dias (ATLI; CANLI, 2008).

Conforme ilustrado na Figura 12, os experimentos com tempo de duração de 7 dias apresentaram valores de indução de MT pouco maiores que o ensaio por 14 dias, para todos os metais, exceto Cd. A diminuição na concentração da proteína para os experimentos de 14 dias pode ser justificada pelo fato de que os organismos possivelmente sofreram um estresse muito intenso, tal que não responderam mais aos contaminantes na mesma proporção que nos experimentos de 7 dias, sugerindo que este tempo seja suficiente para estudos de exposição. Sendo assim, a avaliação da influência do tempo de exposição na resposta indicou um período de 7 dias adequado para obtenção de resultados positivos para indução de MT devido a exposição aos metais Fe, Cu e Pb.

Os resultados obtidos para os experimentos durante 3 dias explorando as concentrações de contaminantes estabelecidas pela Resolução Conama 357/05 estão resumidos na Figura 13. Entende-se por M o ensaio referente à exposição à Mistura dos metais Fe, Cd, Pb e Cu; B o ensaio referente à exposição ao Benzo[a]pireno e MB o ensaio referente à exposição à Mistura dos metais mais o BaP.



**Figura 13.** Níveis de MT no fígado de tilápias expostas durante 3 dias a Ferro, Cádmiio, Chumbo, Cobre, Mistura desses metais, Benzo[a]pireno e Mistura com Benzo[a]pireno e Controle. Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Controle.

A indução de MT hepática para Fe, Cd e MB aumentou com o aumento da concentração de contaminante no meio, de modo que os maiores níveis da proteína foram observados para exposição a uma concentração 5 vezes maior que aquela regulamentada pela Resolução Conama 357/05 para rios classe 3. Para os outros grupos de contaminantes (Cu, Pb, M e BaP) a maior indução foi observada no experimento de exposição a concentrações referentes a classe 3. Os níveis de MT hepática dos peixes expostos a concentrações de Ferro, Cádmiio, Chumbo, Cobre, Mistura desses metais, Benzo[a]pireno e Mistura dos metais mais Benzo[a]pireno regulamentadas para rios classe 3 foram respectivamente 1,21; 1,36; 2,63; 2,57; 2,21; 2,63 e 1,27 vezes maiores em relação ao Controle mantido simultaneamente ao experimento. Para concentrações referentes à classe 2 não houve aumento nos níveis de MT para exposição a Fe, Cu, Pb e Cd mas M, B e

MB apresentaram resultados positivos (1,68; 1,54 e 1,37 vezes respectivamente). Exposição a Fe, Pb, M e MB referentes a uma concentração 5 vezes maior que a regulamentada para a classe 3 apresentou aumento de 1,27; 2,17; 1,72 e 3,34 vezes maior que o observado para o grupo Controle, respectivamente.

Os resultados mostraram que a síntese de MT é significativamente induzida não somente por metais, mas também pelo Benzo[a]pireno, uma vez que este foi um dos contaminante que induziu maiores concentrações da proteína no fígado das tilápias empregadas nos experimentos de exposição (1,54 e 2,63 vezes maior que o controle para classe 2 e classe 3, respectivamente). Essa observação corrobora com trabalhos realizados por outros autores, os quais mostraram que a indução de MT hepática em peixes (*Fundulus heteroclitus*) aumentou em resposta a dieta contendo BaP, sendo 1,57 vezes maior em relação ao controle (ROESIJADI et al., 2009). Em um estudo semelhante ao de Roesijadi e colaboradores (2009), o mesmo comportamento foi observado por van den Hurk e colaboradores (2000). Além disso, ambos os autores mostraram ainda que a exposição conjunta de metais e BaP potencializa a indução das MT. Este comportamento também ocorreu neste trabalho, uma vez que a concentração de MT para MB foram 1,95 vezes maior que a concentração de MT para M, no experimento de exposição 5 vezes classe 3.

Na Tabela 12 estão mostrados valores de conteúdo de MT em organismos aquáticos expostos a Cd e Cu, encontrados na literatura para estudos semelhantes ao presente trabalho.

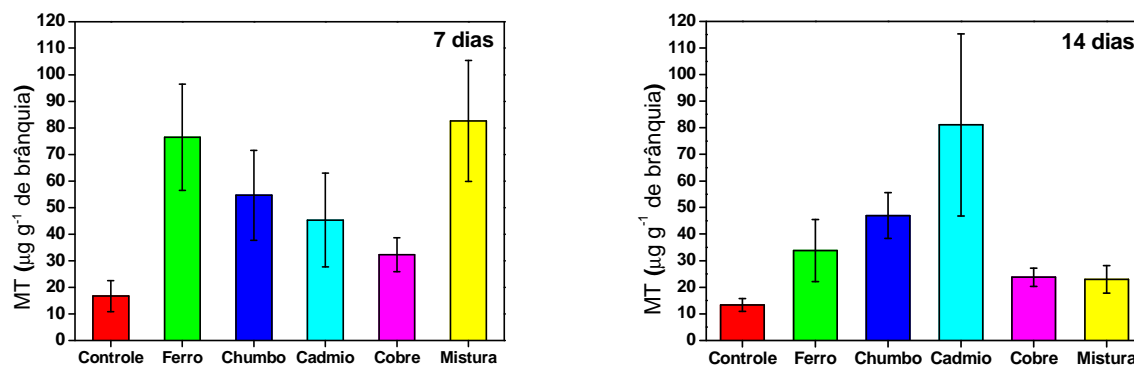
**Tabela 12.** Níveis de metalotioneínas em organismos aquáticos expostos a Cd e Cu, encontrados em trabalhos semelhantes.

Espécie	Conteúdo de MT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido)		Referências
	em peixes expostos a:		
	Cd	Cu	
<i>Oreochromis niloticus</i>	36,12±8,02	66,34±1,96	Este trabalho
<i>Seriola dumerilli</i>	1,60±0,50	-	Jebali et al., 2006
<i>Dicentrarchus labrax</i>	0,07±0,01	0,12±0,02	Jebali et al., 2008
<i>Sparus aurata</i>	379,80±109,95	399,53±36,66	Ghedira et al., 2010
<i>Lymnaea stagnalis</i>	180,00±50,0	-	Desouky, 2012

- resultado não disponível

A concentração de metalotioneínas em peixes expostos a Cd encontrada neste trabalho ( $36,12\pm 8,02 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido) não ultrapassa a encontrada por Ghedira *et alii* (2010) para peixes *Sparus aurata* ( $379,80\pm 109,95 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido), e a encontrada por Desouky (2012) para moluscos *Lymnaea stagnalis* ( $180,00\pm 50,0 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido). Porém, quando comparado a outros animais, a indução observada foi maior, ultrapassando níveis encontrados por Jebali et al. (2006) para peixes *Seriola dumerilli* ( $1,60\pm 0,50 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido) e por Jebali et al. (2008) para peixes *Dicentrarchus labrax* ( $0,07\pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido). A concentração de metalotioneínas em peixes expostos a Cu, encontrada neste trabalho ( $66,34\pm 1,96 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido) também foi maior que a encontrada por Jebali et al. (2008) ( $0,12\pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido).

Foi ainda investigada a indução de metalotioneínas branquiais para o experimento mantido por 7 e 14 dias para peixes expostos a todos os metais individualizados e na mistura para a concentração equivalente a de rios classe 3. Os resultados estão ilustrados na Figura 14.



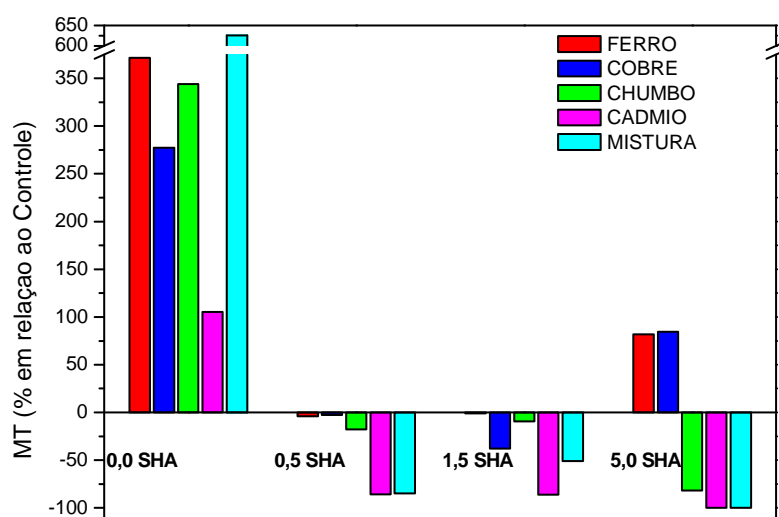
**Figura 14.** Níveis de metalotioneínas em brânquias de tilápias expostas a Fe, Pb, Cd, Cu e mistura, além do controle durante 7 e 14 dias.

No que se refere ao tempo de exposição, observou-se que para os peixes expostos a metais isolados além da mistura desses contaminantes, durante 7 dias (4,57; 3,27; 2,71; 1,93 e 4,94 vezes maior que o controle para Fe, Pb, Cd, Cu e Mistura, respectivamente), para todos os metais e mistura houve um aumento na indução das MT branquiais quando comparada ao grupo controle. Os experimentos correspondentes ao tempo de exposição de 14 dias, também apresentaram um aumento na indução de MT, quando comparado com o grupo controle, (2,54; 3,52; 6,10; 1,78 e 1,72 vezes maior que o controle para Fe, Pb, Cd, Cu e Mistura, respectivamente).

A quantificação de MT hepáticas dos peixes expostos aos metais apresenta maiores níveis da proteína em relação às medidas nas brânquias, variando de  $17,6 \pm 2,2$  a  $127,5 \pm 17,1 \mu\text{g g}^{-1}$  para fígado e de  $13,3 \pm 2,4$  a  $82,6 \pm 22,8 \mu\text{g g}^{-1}$  para brânquias. Porém, a indução de MT nas brânquias é muitas vezes maior quando comparada com os mesmos resultados no fígado. O fígado, por ser um órgão de detoxificação, contém naturalmente metalotioneínas, mas as brânquias que não possuem tal função, não têm grandes níveis dessa proteína.

### 5.6.3. Influência da presença de SHA na água na indução de metalotioneínas

Na Figura 15 estão mostrados os resultados de conteúdo de MT hepática em tilápias, obtidos para os experimentos na ausência e na presença de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA, expressos em porcentagem em relação aos grupos Controle. Os valores positivos representam aumento na indução e os valores negativos representam diminuição na indução da proteína quando comparada com o grupo Controle.



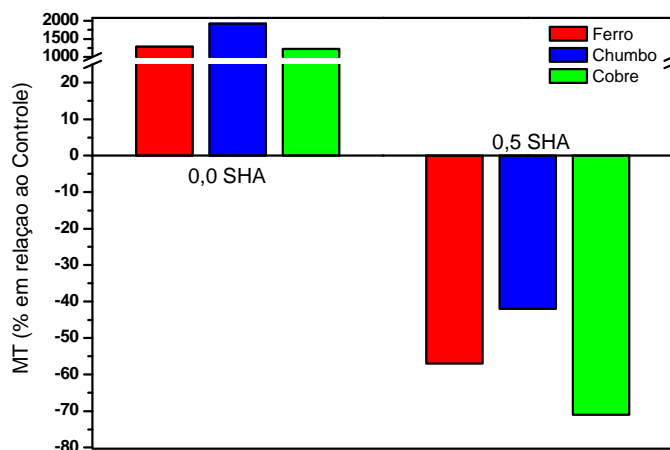
**Figura 15.** Conteúdo de MT hepática em tilápias expostas durante 7 dias a Ferro, Cobre, Chumbo, Cádmio e Mistura desses metais na ausência e com concentrações de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA. Os resultados estão expressos em porcentagem de indução em relação ao grupo Controle.

Para o experimento com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA, houve diminuição nos níveis de MT para exposição a Fe, Cu, Pb, Cd e Mistura dos metais, cerca de 4%, 3%, 18%, 86% e 85% comparados ao grupo Controle. Um comportamento semelhante foi observado para o experimento na presença de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA, houve diminuição nos níveis de MT para exposição a Cu, Pb, Cd, e



Mistura dos metais, cerca de 40%, 9%, 86% e 51% em relação ao grupo Controle, respectivamente. Já o experimento conduzido na presença de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA a exposição aos metais Pb e Cd e Mistura dos metais apresentou redução de cerca de 100% na indução de MT. Para alguns grupos deste experimento, bem como para todos os indivíduos do grupo exposto às águas do rio Preto, os níveis de MT hepática não foram detectados, mostrando que as SHA complexam os metais diminuindo a disponibilidade dos mesmos para interagir com a biota.

Do mesmo modo também foi avaliada a influencia das SHA por meio da quantificação de MT branquial das tilápias expostas a Fe, Pb e Cu na ausência e na presença de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA, conforme ilustrado na Figura 16.



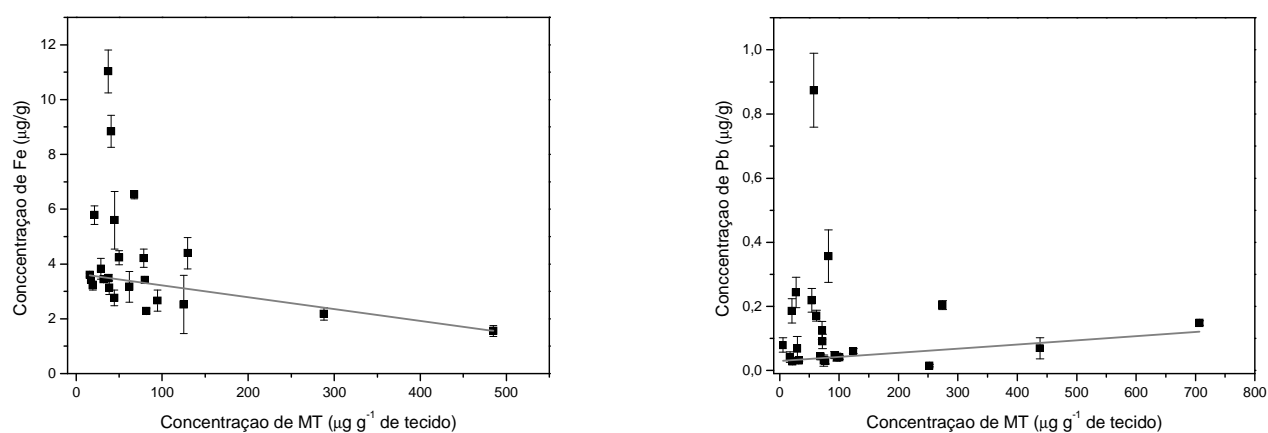
**Figura 16.** Conteúdo de MT branquial em tilápias expostas durante 7 dias a Ferro, Chumbo e Cobre na ausência e na presença de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SHA. Os resultados estão expressos em porcentagem de indução em relação ao grupo Controle.

Baseado na Figura 16 é possível observar que, enquanto ocorreu um aumento nos níveis de metalotioneínas branquiais de até dezenove vezes em relação ao grupo Controle na

ausência de SHA, houve diminuição de 57%, 42% e 71% para exposição a Fe, Pb e Cu, respectivamente, na presença de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de SHA.

Estudos realizados na bacia hidrográfica do Turvo-Grande, onde o rio Preto está inserido, demonstraram por meio de experimentos de complexação de metais com substâncias húmicas aquáticas extraídas deste rio, que a presença de tais substâncias altera a disponibilidade de metais no ambiente aquático. Melo (2010) observou que a capacidade de complexação das SHA com os metais  $\text{Al}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  e  $\text{Ni}$  diminui na seguinte ordem  $\text{Cr}^{3+} > \text{Ni} > \text{Cr}^{6+} > \text{Al}$ . Em um estudo semelhante, Tadini (2013) concluiu que capacidade de complexação das substâncias húmicas aquáticas para o íon  $\text{Cr}^{6+}$  variou em função da sazonalidade, sendo maior no período de seca.

Com os dados obtidos neste trabalho para Fe e Pb quantificados no músculo e níveis de metalotioneínas no tecido dos peixes expostos a esses metais nos experimentos, foi possível observar se houve correlação entre tais parâmetros, conforme mostrado na Figura 17.



**Figura 17.** Correlação entre concentração de Fe e Pb quantificados no tecido muscular e concentração de metalotioneínas quantificadas no tecidos dos peixes expostos a esses metais.

Correlações não significantes foram observadas entre concentração de Fe e Pb quantificados no tecido muscular e concentração de metalotioneínas quantificadas no tecidos dos peixes.

Este trabalho pode ser considerado pioneiro em função de pesquisa realizada na base de dados “Science Direct” com as palavras “aquatic humic substances”, “metallothionein” e “tilápia”. Assim, neste estudo foi observado que houve uma tendência à diminuição da indução das MT com o aumento da concentração das SHA no meio. Estas observações juntamente com os dados obtidos para concentrações de metais “livres”, ou seja, aquele que não está complexado às SHA (Tabela 8), reforçam a afirmação de que a presença de tais substâncias diminui a disponibilidade de metais, diminuindo sua toxicidade e aumentando a tolerância dos organismos a concentrações elevadas desses composto.

## **6. CONCLUSÃO**

- Foi possível padronizar um método para quantificação de Metalotioneínas em peixes por HPLC com detector de fluorescência e os resultados revelaram que a quantificação de MT hepática e branquial em tilápias do Nilo pode ser usada como biomarcador ambiental para os metais Fe, Cd, Cu e Pb e também a Benzo[a]pireno, sendo uma importante ferramenta para o monitoramento ambiental.

- A avaliação da influência do tempo de exposição na resposta indicou um período de 7 dias adequado para obtenção de resultados positivos para indução de MT devido a exposição de tilápias aos metais estudados individualmente e na mistura.

- As SHA influenciaram na bioacumulação de Pb, tornando o metal menos biodisponível, enquanto os fatores determinantes da acumulação de Fe no tecido muscular dos peixes foram tempo de exposição e concentração do metal no meio.

- Os resultados mostraram que a síntese de MT em tilápias é significativamente induzida não somente por metais, mas também pelo Benzo[a]pireno além da exposição conjunta de metais e BaP, evidenciando a importância de estudos com biomarcadores ambientais na presença de mistura de poluentes.

- Conclui-se que as SHA diminuem a disponibilidade de metais, diminuindo a toxicidade do meio aquático e aumentando a tolerância dos organismos a concentrações elevadas desses compostos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 9898: preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores, Rio de Janeiro, 1987.
- ADEYEYE, E. I.; AKINYUGHA, N. J.; FESOBI, M. E.; TENABE, V. O. Determination of some metals in *Clarias gariepinus* (Cuvier and Valenciennes) , *Cyprinus carpio* (L.) and *Oreochromis niloticus* (L.) fishes in a polyculture fresh water pond and their environments. *Aquaculture*, 147, 205-214, 1996.
- AGUSA, T., KUNITO, T., SUDARYANTO, A., MONIRITH, I., KAN-ATIREKLAP, S., IWATA, H. Exposure assessment for trace elements from consumption of marine fish in Southeast Asia. *Environmental Pollution*, 145, 766–777, 2007.
- AKSU, Z. ; AÇIKEL, U. ; KABASAKAL, E. ; TEZER, S. Equilibrium modelling of individual and simultaneous biosorption of chromium(VI) and Nickel (II) onto dried activated sludge. *Water Research*, 36, 3063-3073, 2002.
- ALMEIDA, F.V.; CENTENO, A.J.; BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, 30, 1976-1985, 2007.
- ALHAMA, J.; ROMERO-RUIZ, A.; LÓPEZ-BAREA, J. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1107, 52-58, 2006.
- ALHASHEMI, A. H.; KARBASSI, A.; KIABI, B. H.; MONAVARI, S. M.; SEKHAVATJOU, M. S. Bioaccumulation of trace elements in different tissues of three commonly available fish species regarding their gender, gonadosomatic index, and condition factor in a wetland ecosystem. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 1865–1878, 2012.
- AMIN, O. A.; COMOGLIO, L. I.; RODRIQUEZ, E. M. Toxicity of cadmium, lead and zinc to larval stages of *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 527–534, 2003.

- ANTUNES, S. C.; FIGUEIREDO, D.R.; MARQUES, S.M.; CASTRO, B.B.; PEREIRA R.; GONÇALVES, F. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment*, 374, 252–259, 2007.
- ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TUKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143, 218-224, 2006.
- ATLI G.; CANLI M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 282–287, 2007.
- ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, 33–38, 2008.
- APHA - American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, 2005.
- AZEVEDO, F. A.; CHANSIN, A. A. M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: Rima, 2003.
- AZEVEDO, J. S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; BRAGA, E. S.; FÁVARO, D. I.; BEBIANNO, M. J. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. *Ecotoxicology*, 18, 1001-1010, 2009.
- BALLDWIN, D. H.; TATARA, C. P.; SCHOLZ, N. L. Copper-induced olfactory toxicity in salmon and steelhead: Extrapolation across species and rearing environments. *Aquatic Toxicology*, 101, 295-297, 2011.
- BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320-325, 2010.



- BARRON, M.G. Bioconcentration--Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? *Environmental Science & Technology*, 24, 1612-1618, 1990.
- BERNAL-HERNÁNDEZ, Y. Y.; MEDINA-DIÁZ, L. M.; ROBLEDO-MARENCO, M. L.; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, J. B.; GIRÓN-PÉREZ, M. I.; ORTEGA-CERVANTES, L.; MALDONADO-VÁZQUEZ, W. A.; ROJAS-GARCIA, A. E. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology*, 19, 819-825, 2010.
- BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLERANEAU, C.; GUERBEJ, H.; NANBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology Biochemistry*, 34, 201-207, 2008.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)> Acesso em: 20 de Maio de 2013.
- BROOKS, S. J.; BOLAM, T.; TOLHURST, L.; BASSET, J.; LA ROCHE, J.; WALDOCK, M.; BARRY, J.; THOMAS, K. V. Dissolved organic carbon reduces the toxicity of copper to germlings of the macroalgae, *Fucus vesiculosus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 88, 2007.
- BURBA, P.; VAN DEN BERGH, J.; KLOCKOW, D. On-site characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal loads by means of mobile size fractionation and exchange techniques. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 371, 660-669, 2001.
- CANLI, M.; ATLI, G. The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, 121, 129-136, 2003.
- CAO, J. LAM, K. C.; DAWSON, R. W.; LIU, W. X.; TAO, S. The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of  $\text{Cu}^{+2}$  by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. *Chemosphere*, 54, 507-514, 2004.

- CARITÁ, R. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes - SP, Dissertação de Mestrado, UNESP-Rio Claro, 2010.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURBA, J. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 67, 1-27, 2008.
- CARVALHO, C. S.; SELIESTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FERNANDES, M. N. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 225-234, 2004.
- CAVALCANTE, A. L. M. Parâmetros sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento ambiental de chumbo. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.
- CHOUDHRY, G. G. *The handbook of environmental chemistry*; Springer-Verlag, 1982.
- COIMBRA, T. M. G. Análise da expressão da Metalotioneína em duas espécies de peixes, *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 20 de Maio de 2013.
- DABRIO, M.; RODRÍGUEZ, A. R.; BORDIN, G.; BEBIANNO, M. J.; DE-LEY, M.; SESTÁKOVÁ, I.; VASÁK, M.; NORDBERG, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88, 123-134, 2002.
- DESOUKY, M. M. A. Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminum, exposure. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 65, 139-143, 2012.
- DE PAOLIS, F.; KUKKONEN, J. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere*, 34, 1693-1704, 1997.

- FANG, Y.; YANG, H.; LIU, B. Tissue-specific response of metallothionein and superoxide dismutase in the clam *Macra veneriformis* under sublethal mercury exposure. *Ecotoxicology*, 21, 1593-1602, 2012.
- FARAG, A. M.; NIMICK, D. A.; KIMBALL, B. A.; CHURCH, S. E.; HARPER, D. D.; BRUMBAUGH, W. G. Concentrations of metals in water, sediment, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish in the Boulder River Watershed, Montana, and the role of colloids in metal uptake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 397-409, 2007.
- GALLO, M.; TRENTO, A.; ALVAREZ, A.; BELDOMÉNICO, H.; CAPAGNOLI, D. Dissolved and particulate heavy metal in the Salado River (Santa Fe, Argentina). *Water, Air and Soil Pollution*, 174, 367-384, 2006.
- GHEDIRA, J.; JEBALI, J.; BOURAOU, Z.; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; BOUSSETTA, H. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparaus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *Fish Physiology Biochemistry*, 36, 101-107, 2010.
- GIESY, J. P.; WIENER, J. G. Frequency distributions of trace metal concentrations in five freshwater fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*. 106, 393-402, 1977.
- GOWD, S. S.; GOVIL, P. K. Distribution of heavy metals in surface water of Ranipet industrial area in Tamil Nadu, India. *Environmental Monitoring Assessment*, 136, 197-207, 2008.
- HEATH, A.G. *Water pollution and fish physiology*. Lewis publishers. 1995.
- HEJABI, A. T.; BASAVARAJAPPA, H. T.; KARBASSI, A. R.; MONAVARI, S. M. Heavy Metal Pollution in Kabini River Sediments. *International Journal of Environmental Research*, 4, 629-636, 2010.
- International Humic Substances Society (IHSS). Disponível em: <<http://www.humicsubstances.org/isolation.html>> Acesso em: 20 de Maio de 2013.

- JABEEN, F.; CHAUDHRY, A. S. Environmental impacts of anthropogenic activities on the mineral uptake in *Oreochromis mossambicus* from Indus River in Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166, 641-651, 2010.
- JEBALI, J.; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E. A.; BANNAOUI, A.; BOUSSETTA, H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and Metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32, 93-98, 2006.
- JEBALI, J.; BANNI, M.; GERBEJ, H.; BOUSSETTA, H.; LÓPEZ-BAREA, J.; ALHAMA, J. Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment By RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research*, 65, 358-363, 2008.
- JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A. I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C. M.; MORENO I.; CAMEÁN, N. A. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 72, 261-271, 2005.
- KÄGI, J. H. R. Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology*, 205, 613-626, 1991.
- KARADEDE, H.; OYMAK, S. A.; ÜNLÜ, E. Heavy metals in mullet, *Liza abu*, and catfish, *Silurus triosegus*, from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Environmental International*, 30, 183-188, 2004.
- KARASU BENLI, A. C.; KÖKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 339-344, 2005.
- KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poison, 815, 2001.
- KLASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity, *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 39, 267-294, 1999.

- KLIGOUR, B. W. Cadmium uptake from cadmium-spiked sediments by four freshwater invertebrates. *Bulletin of Environ. Contamination Toxicology*, 47, 70-75, 1991.
- KROM, M. D. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst*, 105, 305-316, 1980.
- Kubitza, F. Nutrição e alimentação de Tilápias – Parte 1; Panorama da Aquicultura, 1999.
- LAMELAS, C.; WILKINSON, K. J.; SLAVEYKOVA, V. I. Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science and Technology*, 39, 6109-6116, 2005.
- LARINI, L. Toxicologia. São Paulo: Manole, 1987.
- LEVERSEE, G. J.; LANDRUM, P. F.; GIESY, J. P.; FANNIN, T. Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40, 63-69, 1983.
- LIANG, Y.; CHEUNG, R. Y. H.; WONG, M. H. Reclamation of wastewater for polyvulture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water Research*, 33, 2690-2700, 1999.
- LICATA, P.; DI BELLA, G.; DUGO, G.; NACCARI, F. Organochlorine pesticides, PCBs and heavy metals in tissues of the mullet *Liza aurata* in lake Ganzirri and Straits of Messina (Sicily, Italy). *Chemosphere*, 52, 231-238, 2003.
- LICATA, P.; TROMBETTA, D.; CRISTANI, M.; MARTINO, D.; NACCARI, F. Organochlorine compounds and heavy metals in the soft tissue of the mussel *Mytilus galloprovincialis* collected from Lake Faro (Sicily, Italy). *Environmental International*, 30, 805-810, 2004.
- LICATA, P.; TROMBETTA, D.; CRISTANI, M.; NACCARI, C.; MARTINO, D.; CALÒ, M.; NACCARI, F. Heavy metals in liver and muscle of Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*)

- caught in the straits of Messina (Sicily, Italy). *Environmental Monitoring and assessment*, 107, 239-248, 2005.
- LINDE, A. R.; SÁNCHEZ-GALÁN, S.; KLEIN, D.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; SUMMER, K. H. Metallothionein and Heavy Metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European Eel (*Anguilla anguilla*): A Comparative Study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 168-173, 1999.
- LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F., ALBUQUERQUE, C.; FREIRE, M. M.; MOREIRA, J. C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*, 399, 186-192, 2008.
- LOCATELLI, M. A. F. investigação sobre a emissão e caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na bacia do rio Atibaia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- LORENZO, J. I.; NIETO, O.; BEIRAS, R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* in seawater. *Aquatic Toxicology*, 58, 27-41, 2002.
- LOWE, T.P.; MAY, T. W.; BRUMBAUGH, W. G.; KANE, D. A. National contaminant biomonitoring program: concentrations of seven elements in freshwater fish, 1978-1981. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 4, 363-388, 1985.
- MA, H.; KIM, S. D.; CHA, D. K.; ALLEN, H. E. Effect of kinetics complexation by humic acid of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 828-837, 1999.
- MACKAY, D.; FRASER, A. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110, 375-391, 2000.

- MAN, A. K. Y.; WOO, N. Y. S. Upregulation of Metallothionein and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in silver sea bream, *Sparus sarba* exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology*, 89, 214-221, 2008.
- MANAHAN, S. E. *Environmental Science and Technology*, Lewis, 1997.
- MCCARTHY, J. F.; JIMENEZ, B. D.; BARBEE, T. Effect of dissolved humic material on accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationships. *Aquatic Toxicology*, 7, 15-24, 1985.
- MELO C. A., TOFFOLI A. L., MOREIRA A. B., BISINOTI M. C. Solar Radiation Effect on the Complexation Capacity of Aquatic Humic Substances with Metals. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, in press, 2012.
- MELO, C. A. Caracterização e dinâmica de metais em rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, 2010.
- MOK, W. J.; SENOO, S.; ITOH, T.; TSUKAMASA Y.; KAWASAKI, K.; ANDO, M. Assessment of concentrations of toxic elements in aquaculture food products in Malaysia. *Food Chemistry*, 133, 1326–1332, 2012.
- NOGUEIRA, P. F. M. MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). *Freshwater Biology*, Oxford, 50, 1560-1567, 2005.
- NOGUEIRA, L; RODRIGUES, A. L. F.; TRÍDICO, C. P.; FOSSA, C. E.; ALMEIDA, E. A. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 180, 243-255, 2011.

- OLIVEIRA, C. P. F. Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – AM, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas – Inpa/Ufam, 2003.
- PATHIRATNE, A.; CHANDRASEKERA, W. H. U.; PATHIRATNE, K. A. S. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156, 361-375, 2009.
- PEAKALL, D. W. Biomarkers: The way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1, 55-60, 1994.
- PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água: Uma revisão. Instituto de Pesca, São Paulo, 31, 81-88, 2005.
- PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase Activity, Lipid Peroxidation, and Bioaccumulation in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to Cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 1008-1014, 2010.
- PRZYTARSKA, J. E.; SOKOŁOWSKI, A.; WOŁOWICZ, M.; HUMMEL, H.; JANSEN, J. Comparison of trace metal bioavailabilities in European coastal waters using mussels from *Mytilus edulis* complex as biomonitors. *Environmental Monitoring Assessment*, 166, 461-476, 2010.
- QIU, Y.; LIN, D.; LIU, J.; ZENG, E. Y. Bioaccumulation of trace metals in farmed fish from South China and potential risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 284-293, 2011.
- RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International*, 27, 27-33, 2001.



- REGOLI, F., NIGRO, M., BENEDETTI, M., GORBI, S., PRETTI, C., GERVASI, P.G., FATTORINI, D. Interactions between metabolism of trace metals and xenobiotic agonists of the aryl hydrocarbon receptor in the antarctic fish *Trematomus bernacchii*: environmental perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1475–1482, 2005.
- RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, 32, 116-122, 2011.
- ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; *Substâncias Húmicas Aquáticas: interações com espécies metálicas*. São Paulo: Ed. UNESP, 2003.
- RODRÍGUEZ-FUENTES G.; GOLD B. G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research*, 58, 505–509, 2004.
- ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113, 117-123, 1996.
- ROESIJADI, G.; REZVANKHAH, S.; PEREZ-MATUS, A.; TORRUELLAS, K.; VAN VELD, P. A. Dietary cadmium and benzo(a)pirene increased intestinal metallothionein expression in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research*, 67, 25-30, 2009.
- ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, A. B.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. *Eclética Química*, 27, 383-391, 2002.
- Romero-Isart, N.; Vasák, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. ***Journal of Inorganic Biochemistry***, v. 88, p. 388–396, 2002.

- ROMERO-RUIZ, A.; ALHAMA, J.; BLASCO, J.; GÓMEZ-ARIZA, J. L.; LÓPEZ-BAREA, J. New metallothionein assay in *Scrobicularia plana*: Heating effect and correlation with other biomarkers. *Environmental Pollution*, 156, 1340-1347, 2008.
- SALVADOR, G. A.; ROMINAN, M. U.; GIUSTO, N. M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011.
- SANCHEZ-MARÍN, P.; LORENZO, J. I.; BLUST, R.; BEIRAS, R. Humic Acids Increase Dissolved Lead Bioavailability for Marine Invertebrates. *Environmental Science and Technology*, 41, 5579-5684, 2007.
- SANTOS, A.; BELLIN, I. C.; CORBI, P. P.; CUIN, A.; ROSA, A. H.; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, J. C.; MELNIKOV, P. Competition Between Humic Substances and  $\alpha$ -Amino Acids by Metal Species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 437-440, 2004.
- SANTOS, M. A. P. F.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). *Ecotoxicology*, 17, 449-454, 2008.
- SCHMITT, C. J.; WHYTE, J. J.; ROBERTS, A. P.; ANNIS, M. L.; MAY, T. W.; TILLITT, D. E. Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 67, 31-47, 2007.
- SILVA, F. S.; CRISTALE, J.; ANDRÉ, P. A.; SALDIVA, P. H. N.; MARCHI, M. R. R. PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>: The influence of sugarcane burning on potential câncer risk. *Atmospheric Environmet*, 44, 5133-5138, 2010.
- SORENSEN, E.M.B. Metal poisoning in fish. Boca Raton, 1991.
- SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, 605, 87-93, 2006.
- STROGYLOUDI, E.; ANGELIDIS, M. O.; CHRISTIDES, A.; PAPATHANASSIOU, E. Metal concentration and metallothionein levels in *Mytilus galloprovincialis* from Elefis bay

- (Saronikos gulf, Greece). *Environmental Monitoring and Assessment*, 12, 7189-7205, 2012.
- TADINI, A. Substâncias Húmicas Aquáticas: Caracterização e Interação com íons Crômio e Proposta de um Indicador de Matéria Orgânica Lábil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE/UNESP, 2013.
- TAO, S.; LIANG, T.; CAO, J.; DAWSON, R. W.; LIU, C. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 190-195, 1999.
- TOMAZELLI, A. C.; MARTINELLI, L. A.; AVELAR, W. A. P.; CAMARGO, P. B.; FOSTIER, A. H.; FERRAZ, E. S. B.; KRUG, F. J.; JÚNIOR, D. S. Biomonitoring of Pb and Cd in Two Impacted Watersheds in Southeast Brazil, Using the Freshwater Mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia : Mycetopodidae) as a Biological Monitor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 673-684, 2003.
- TONISSI, F. B. Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em marcadores de estresse oxidativo, em brânquias, fígado e rim de *Oreochromis niloticus*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2009.
- USEPA Agência de Proteção Ambiental Americana. National recommended water quality criteria-correction. EPA-822/Z-99-001. Disponível em: <[http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2008\\_03\\_11\\_criteria\\_wqctable\\_1999table.pdf](http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2008_03_11_criteria_wqctable_1999table.pdf)> Acesso em: 20 de Maio de 2013.
- USEPA Agência de Proteção Ambiental Americana. National recommended water quality criteria-correction. EPA-822/R-01-001. Disponível em: <[http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2001\\_04\\_13\\_criteria\\_cadmium\\_cad2001upd.pdf](http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2001_04_13_criteria_cadmium_cad2001upd.pdf)> Acesso em: 20 de Maio de 2013.
- USEPA Agência de Proteção Ambiental Americana. Locating and estimating air emissions from sources of polycyclic organic matter. EPA-454/R-98/014. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttnchie1/le/pompta.pdf>> Acesso em: 20 de Maio de 2013.

- U. S. GEOLOGICAL SURVEY. National Water Quality Laboratory - Preparation procedure for Aquatic Biological Material Determined for Trace Metals, 1996.
- VANPARYS, C.; DAUWE, T.; CAMPENHOUT, K. V.; BERVOETS, L.; DE COEN, W.; BLUST, R.; EENS, M. Metallothioneins (MTs) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment*, 401, 184-193, 2008.
- VAN DEN HURK, P.; FAISAL, M.; ROBERTS JR., M. H. Interactive effects of cadmium and benzo[a]pirene on metallothionein induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Marine Environmental Research*, 50, 83-87, 2000.
- VARIAN AUSTRALIA PTY LTD. Analytical Methods. Flame Atomic Absorption spectrometry, 1988.
- VOLYNSKII, A. B. Chemical Modifiers in modern electrothermal absorption spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 50, 905-921, 2003.
- WANG, W. X. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Marine Ecology Progress Series*, 243, 295-309, 2002.
- WOOD, S.A. The role of humic substances in the transport and fixation of metals of economic interest (Au, Pt, Pd, U, V). *Ore Geology Reviews*, 11, 1-31, 1996.
- WU, S. M.; SHIH, M. J.; HO, Y. C. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 218-226, 2007.
- YLMAZ, A. B.; SANGÜN, M. K.; YAGHOGLU, D.; TURAN, C. Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from Iskenderum Bay, Turkey. *Food Chemistry*, 123, 410-415, 2010.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos: Rima, 2006.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1984.

ZHOU, S. Bioaccumulation of Cu, Se and Hg in Fish Tissues of the Sudbury Area Lakes. Tese de Doutorado, Laurentian University, Ontario, 1997.

## **8. ANEXOS**

**ANEXO 1: Massa e comprimento dos peixes utilizados para os experimentos que simularam as concentrações previstas em rios Classe 2 e 3.**

Peixe	CLASSE 2		CLASSE 3	
	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)
C1	13	68,50	15,0	96,88
C2	14	84,79	15,0	97,04
C3	12	55,93	13,5	79,38
C4	14	86,16	15,0	98,14
C5	16	116,75	13,5	72,64
Fe1	16	118,83	13,5	83,71
Fe2	14,5	94,00	14,0	88,45
Fe3	16	114,23	13,0	67,34
Fe4	13	63,90	13,5	80,66
Fe5	13,5	71,07	14,0	82,46
Cd1	15	103,60	14,0	88,27
Cd2	15	98,19	15,0	107,43
Cd3	13,5	73,68	13,5	74,87
Cd4	14	80,83	14,0	83,98
Cd5	14	74,45	15,5	109,48
Pb1	15	96,02	14,5	88,00
Pb2	15	95,89	14,5	89,90
Pb3	13,5	71,31	14,0	87,93
Pb4	14	77,35	12,5	63,79
Pb5	13	64,90	14,0	82,43
Cu1	15	88,03	16,0	115,16
Cu2	16	106,81	13,0	79,83
Cu3	13,5	75,40	15,0	110,53
Cu4	13	64,45	15,0	101,00
Cu5	13	70,02	14,0	76,54
B1	15,5	106,48	14,0	72,07
B2	15	93,28	15,5	123,01
B3	14,5	86,45	15,0	92,74
B4	14,5	87,08	14,0	86,92
B5	16	108,90	14,5	90,70
M1	17	74,85	14,0	84,34
M2	15	102,11	13,5	73,21
M3	15	84,43	13,5	83,45
M4	12,5	65,10	12,5	67,65
M5	14,5	84,88	12,5	57,47
MB1	13	65,14	15,0	94,10
MB2	14	76,95	13,5	79,60
MB3	15	92,93	14,5	82,20
MB4	14	85,25	14,0	87,60
MB5	15	92,80	13,5	73,02

**ANEXO 2: Massa e comprimento dos peixes utilizados para os experimentos durante 7 e 14 dias que simularam as concentrações previstas em rios Classe 3.**

Peixe	7 DIAS		14 DIAS	
	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)
<b>C1</b>	15,00	101,80	14,00	76,55
<b>C2</b>	15,50	115,66	16,00	113,87
<b>C3</b>	15,00	104,80	16,50	117,13
<b>C4</b>	14,00	81,60	14,00	75,26
<b>C5</b>	15,00	104,94	16,00	111,90
<b>Fe1</b>	16,00	118,10	14,00	73,51
<b>Fe2</b>	14,50	86,00	15,00	89,74
<b>Fe3</b>	15,00	97,20	17,00	114,98
<b>Fe4</b>	15,00	100,60	17,00	135,00
<b>Fe5</b>	17,50	120,60	15,50	97,10
<b>Cd1</b>	14,50	87,01	15,00	84,30
<b>Cd2</b>	13,50	76,40	15,00	81,50
<b>Cd3</b>	15,00	111,15	15,00	95,00
<b>Cd4</b>	14,50	94,00	14,60	73,60
<b>Cd5</b>	14,50	98,92	15,00	83,80
<b>Pb1</b>	18,00	146,17	16,00	105,50
<b>Pb2</b>	12,00	51,55	14,00	76,70
<b>Pb3</b>	16,00	115,40	15,00	89,70
<b>Pb4</b>	12,50	65,78	13,00	45,20
<b>Pb5</b>	13,50	83,60	16,50	121,00
<b>Cu1</b>	16,50	117,89	17,50	125,50
<b>Cu2</b>	18,00	117,60	14,00	76,70
<b>Cu3</b>	14,00	79,41	13,50	60,60
<b>Cu4</b>	14,50	85,55	15,00	79,70
<b>Cu5</b>	15,00	101,50	15,50	101,70
<b>M1</b>	15,00	92,58	15,00	86,90
<b>M2</b>	16,50	128,40	16,00	119,00
<b>M3</b>	15,00	92,40	16,50	112,40
<b>M4</b>	14,50	84,75	16,00	101,50
<b>M5</b>	14,00	71,50	15,00	83,70



**ANEXO 3: Massa e comprimento dos peixes utilizados para os experimentos que simularam as concentrações previstas em rios Classe 3 na presença de 0,5; 1,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de SHA.**

Peixe	0,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		1,5 mg L <sup>-1</sup> SHA		5,0 mg L <sup>-1</sup> SHA	
	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)
C1	12,00	51,30	13,50	66,22	13,50	81,40
C2	11,50	47,68	11,50	45,87	13,00	71,34
C3	12,00	59,41	14,00	69,83	13,50	78,48
C4	11,50	49,32	12,00	59,15	13,50	94,08
C5	14,00	87,51	12,00	45,19	12,00	44,16
CSH1	12,50	61,33	-	-	13,50	78,40
CSH2	14,00	74,07	13,50	57,42	13,50	76,65
CSH3	11,50	48,55	14,00	88,57	15,00	108,18
CSH4	13,00	68,25	14,50	96,22	14,50	92,35
CSH5	11,50	46,41	-	-	11,00	42,98
Fe1	14,00	78,16	12,00	53,71	14,00	72,06
Fe2	-	-	11,50	48,07	13,50	84,58
Fe3	11,00	40,02	11,50	53,33	14,00	103,21
Fe4	13,50	66,12	12,50	68,79	15,50	44,31
Fe5	13,00	64,45	-	-	11,50	89,24
Cu1	11,00	41,07	12,50	51,14	15,00	74,97
Cu2	14,00	80,02	12,50	56,20	13,50	100,36
Cu3	14,00	85,14	13,50	89,31	15,00	85,03
Cu4	14,50	92,21	13,50	78,73	14,50	39,26
Cu5	13,50	82,31	12,00	52,62	11,50	72,34
Pb1	13,50	88,11	12,00	66,37	13,50	107,43
Pb2	13,00	67,42	13,50	86,37	15,00	75,28
Pb3	12,50	55,85	12,00	54,31	14,00	73,15
Pb4	12,00	58,03	15,00	97,25	13,50	47,41
Pb5	13,00	64,22	14,50	99,31	12,00	113,13
Cd1	12,00	56,91	12,00	61,08	16,00	67,88
Cd2	11,50	48,4	12,00	60,07	13,00	53,07
Cd3	14,50	77,15	11,50	49,38	11,50	42,00
Cd4	13,00	61,08	12,50	57,40	12,00	63,20
Cd5	13,00	57,52	13,50	88,06	13,00	76,06
M1	14,50	92,11	13,00	71,07	14,00	85,76
M2	12,50	70,03	15,50	114,20	15,00	91,28
M3	13,50	85,51	15,00	115,11	15,00	98,13
M4	11,00	48,41	15,00	102,27	15,00	92,83
M5	12,50	67,54	12,00	59,01	14,00	107,66

**ANEXO 4: Massa e comprimento dos peixes utilizados para os experimentos de exposição às águas do rio Preto.**

<b>Águas do rio Preto (1:1 v/v)</b>		
<b>Peixe</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>R1</b>	107,66	15,50
<b>R2</b>	62,30	13,00
<b>R3</b>	98,52	15,00
<b>R4</b>	43,27	11,50
<b>R5</b>	58,55	12,00