

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL – PPG BIO)**

Sylvia Nogueira

**Investigação dos níveis de metais, proteínas e metaloproteínas em
Geophagus brasiliensis como biomarcadores de contaminação ambiental de
uma lagoa antropicamente impactada**

Rio de Janeiro

2016

Sylvia Nogueira

**Investigação dos níveis de metais , proteínas e metaloproteínas em
Geophagus brasiliensis como biomarcadores de contaminação ambiental de
uma lagoa antropicamente impactada**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Neotropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Lourenço Ziolli

Coorientadora: Dr^a. Rachel Ann Hauser-Davis

Rio de Janeiro

Maio de 2016

N778 Nogueira, Sylvia.
Investigação dos níveis de metais, proteínas e metaloproteínas em *Geophagus brasiliensis* como biomarcadores de contaminação ambiental de uma lagoa antropicamente impactada / Sylvia Nogueira, 2016.
86 f. ; 30 cm

Orientadora: Roberta Lourenço Zioli.
Coorientadora: Rachel Ann Hauser-Davis.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biodiversidade Neotropical) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1. Marcadores bioquímicos. 2. Indicadores biológicos. 3. Metais – Toxicologia. 4. Peixe – Efeitos da poluição da água. I. Zioli, Roberta Lourenço. II. Hauser-Davis, Rachel Ann. III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD – 577.27

Sylvia Nogueira

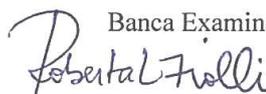
**Investigação dos níveis de metais , proteínas e metaloproteínas em
Geophagus brasiliensis como biomarcadores de contaminação ambiental de
uma lagoa antropicamente impactada**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Neotropical.

Aprovada em: 13/06/2016

Banca Examinadora



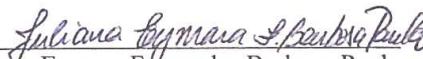
Prof.^a. Dr.^a. Roberta Lourenço Ziolli
(Departamento de Ciências Naturais – UNIRIO)



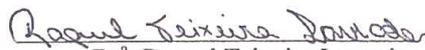
Prof.^a. Dr.^a. Elisabete Fernandes Albuquerque Palermo
(Departamento de Ciências Naturais – UNIRIO)



Prof.^a. Dr.^a. Rachel Ann Hauser-Davis
(Departamento de Ciências Naturais – UNIRIO)



Dr.^a. Juliana Eymara Fernandes Barbosa Paula
(Universidade Federal Fluminense - UFF)



Dr.^a. Raquel Teixeira Lavradas
(Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC-Rio)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus, Yawheh, Krishna, Tupã, Shiva, Jah, Alá*, ou simplesmente ao *Universo* e todas as *energias* que me impulsionaram e permitiram chegar até aqui;

Agradeço à minha filha Maria Luiza, que embora pequena, soube lidar com minhas ausências;

À minha família. Pelo incentivo e apoio no período de estudo para ingresso, durante as disciplinas, viagens para apresentação de trabalho e nesta reta final. Gratidão. Eu não teria chegado até aqui sem vocês;

A todos os amigos que acompanharam esse processo e me botaram pra frente quando as coisas estavam difíceis, às minhas irmãs de coração Mel, Mari e Lí e à dança, melhor válvula de escape do mundo;

Ao meu namorado David que esteve presente me apoiando quando “tudo” dava errado e que agora, mesmo à 9 mil km de distância, continua me motivando todos os dias via *skype*; Terminei ! Já pode vir pro Brasil;

Ao VA Ilques, por me permitir estar no Rio de Janeiro para a realização deste Mestrado;

Ao meu chefe, CA Saboia, pela compreensão, apoio e pelas licenças concedidas em prol deste Mestrado. Muito obrigada;

Aos “companheiros de farda” pelas trocas de serviço e aos demais colegas da DPC-50;

À Colônia de Pescadores da Lagoa Rodrigo de Freitas;

À minha orientadora Roberta Ziolli por acreditar na minha capacidade em meio às tantas outras atividades e obrigações que desempenho;

À minha coorientadora e amiga Rachel, que desde o início sempre esteve presente me ajudando de todas as formas possíveis, sendo muito mais do que uma simples coorientadora. Obrigada pela amizade, atenção, paciência, profissionalismo, conselhos, pelas traduções e puxões de orelha. Obrigada por todo aprendizado e por todo suporte durante esses anos;

À Raquel Lavradas. Agradeço a parceria durante os dias intermináveis de análises experimentais na PUC e a paciência para me explicar coisas “idiotas” quando o assunto era Química;

Às “bonitas” Doutoradas que compõem esta banca. Cada uma de vocês tem uma significância única e especial pra mim;

Ao Professor Nicolás Rey, da PUC-RJ por ceder as dependências do LABSO-BIO para a realização das análises experimentais, assim como pela presteza dos seus alunos de Iniciação Científica, quando solicitados;

Ao Rafael Christian Chávez Rocha pelas aulas de pipetagem, de utilização do ICP-MS e análises de metais nas amostras deste trabalho. Obrigada pela boa vontade;

À Tatiana Dillenburg Saint' Pierre por ceder o ICP-MS para as análises do presente estudo;

À Isabella C.A.C. Bordon (UNESP) pela ajuda com as análises estatísticas multivariadas.

*“Não sei quanto o mundo é bom
Mas ele está melhor
Desde que você chegou
E explicou o mundo pra mim...”*

(Espatódea - Nando Reis)

RESUMO

A contaminação ambiental de ecossistemas aquáticos pode ser avaliada pelo uso de bioindicadores e biomarcadores, além de análises de determinação dos contaminantes de interesse. Neste contexto, o presente estudo investigou os níveis de metais e a expressão de metaloproteínas biomarcadoras de exposição e de estresse oxidativo, a metalotioneína (MT) e a glutatona reduzida (GSH), respectivamente. Os níveis de MT, GSH e metais em músculo, fígado e bÍlis de peixes da espécie *Geophagus brasiliensis* coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas foram determinados por espectrofotometria UV-Vis e ICP-MS. Os níveis de MT seguiram a ordem crescente bÍlis => fígado => músculo. Foi verificado que, aparentemente, a bÍlis constitui uma via mais rápida e eficiente de destoxificação, e a excreção biliar de MT pode ser usada como alternativa para indicar exposição a metais. Elevadas taxas de GSH foram encontradas no fígado sugerindo a eficácia desta proteína no combate ao estresse oxidativo e todos os metais apresentaram níveis superiores ao limites estabelecidos nacional e internacionalmente, tanto para o limite máximo tolerável em alimentos quanto para o consumo diário de metais, sendo em alguns casos, este limite ultrapassado em mais de 10000 vezes, indicando riscos reais aos consumidores humanos que não devem ser ignorados. Diversas correlações estatisticamente significativas foram observadas entre os metais determinados, o IHS, o FC, a GSH e a MT, indicando efeitos dos metais nestes parâmetros morfométricos e bioquímicos.

Palavras-chave: Biomarcadores; Metalotioneína; GSH; Metais; *Geophagus brasiliensis*.

ABSTRACT

Environmental contamination of aquatic ecosystems can be evaluated by the use of biomarkers, as well as the analysis for the determination of contaminants of interest. In this context, the present study investigated the levels of metals and metalloproteins expression considered biomarkers of exposure and oxidative stress, metallothionein (MT) and reduced glutathione (GSH), respectively. MT levels, GSH and metals in muscle, liver and bile of pearl cichlid fish species collected at Lagoa Rodrigo de Freitas were determined by UV-Vis spectrophotometry and ICP-MS. MT levels followed the order bile => liver => muscle. The results shows that, apparently, bile is a faster and more efficient mechanism for detoxification, and excretion of bile MT can be used as an alternative to indicate exposure to metals. High GSH rates were found in the liver suggesting the effectiveness of this protein to combat oxidative stress. All of the analyzed metals were above the established limits, national and international, both for the maximum tolerable limit in foods and for the daily consumption of metals. In some cases, this limit was exceeded more than 10,000 times, indicating real risks to human consumers, that should not be ignored. Several statistically significant correlations were observed between metals, IHS, FC, GSH and MT, indicating effects of metals on these morphometric and biochemical parameters.

Keywords: Biomarkers ; Metallothionein; GSH; Metals; Pearl cichlid.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de contaminação aquática.....	17
Figura 2 – Exemplos de espécies reativas de Oxigênio – ERO.....	25
Figura 3 – Esquema de Estresse Oxidativo.....	26
Figura 4 – Estrutura molecular da Glutathiona reduzida (GSH).....	28
Figura 5 – Estrutura molecular da Metalotioneína (MT).....	30
Figura 6 – Lagoa Rodrigo de Freitas.....	33
Figura 7 – Colônia de Pescadores na lagoa Rodrigo de Freitas.....	35
Figura 8 – Espécime de <i>Geophagus brasiliensis</i>	38
Figura 9 – Anúncio demonstrando o consumo da espécie <i>Geophagus brasiliensis</i> em restaurante de Niterói – RJ.....	39
Figura 10 – Pesagem (A) e dissecação (B) de fígado (C) e músculo (D) em espécimes de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados no presente estudo.....	42
Figura 11 – Localização da vesícula biliar em espécime de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletado no presente estudo.....	42
Figura 12 – Fluxograma das etapas experimentais do presente estudo Dados biométricos de (A) Peso (g) e (B) comprimento (cm) dos indivíduos de <i>Geophagus brasiliensis</i> por estação de coleta (verão N=17/inverno N=20). Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	47
Figura 13 – Dados biométricos de (A) peso (g) e (B) comprimento (cm) dos indivíduos de <i>Geophagus brasiliensis</i> por estação de coleta (verão N=17, inverno N=20). Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	49
Figura 14 – Esquema de coloração das bílis de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletadas nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	50
Figura 15 – Concentrações dos níveis de metais presentes nas bílis dos espécimes de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	51
Figura 16 – Concentrações dos níveis de metais presentes nos fígados dos espécimes de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) verão e inverno do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	51

Figura 17 – Concentrações dos níveis de metais presentes nos músculos dos espécimes de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	53
Figura 18 – Índices Pluviométricos para o ano de 2013 e 2014 para o estado do Rio de Janeiro (Fonte:INMET).....	54
Figura 19 – Níveis de metalotioneína (MT) encontradas no fígado, músculo e na bÍlis dos peixes coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	56
Figura 20 – Níveis de Glutationa (GSH) encontradas no fígado, músculo e na bÍlis dos peixes coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	58
Figura 21 – FC e IHS dos espécimes de <i>Geophagus brasiliensis</i> coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média ± desvio padrão.....	60
Figura 22 – Separação dos componentes principais: Fator 01 x Fator 02 (A) e Fator 02 x Fator 03 (B) na comparação de concentrações de metais e MT em <i>G. brasiliensis</i>	67
Figura 23 – Dendrograma de separação dos dados de bÍlis e fígado de <i>G. brasiliensis</i> pelo método de distância euclidiana de <i>Ward</i> para confirmação dos grupamentos por dissimilaridade.....	68
Figura 24 – Gráficos de dispersão das funções discriminantes de músculo e fígado de <i>G. brasiliensis</i> por estação. MV – Músculo verão; MI – Músculo inverno; FI – Fígado inverno; FV – Fígado verão.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Condições instrumentais do ICP-MS.....	44
Tabela 2 – Porcentagem e quantidade de amostras de bÍlis classificadas de acordo com a escala de cor determinada no presente estudo.....	57
Tabela 3 - Tabela indicativa dos indivíduos com concentrações acima dos níveis médios para metais e MT dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> com bÍlis mais diluída, de acordo com a escala de cor determinada no presente estudo.....	59
Tabela 4 - Correlações encontradas em fÍgados dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.....	63
Tabela 5 - Correlações encontradas em fÍgados dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> na estação de inverno e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.....	63
Tabela 6 – Correlações encontradas em músculos dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.....	63
Tabela 7 – Correlações encontradas em músculos dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> na estação de inverno e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.....	64
Tabela 8 – Correlações encontradas na bÍlis dos espécimes de <i>G. brasiliensis</i> na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.....	64
Tabela 9 – Limites Máximos de Tolerância (LMT) (dados como valor máximo ou valores mínimos e máximos) relacionados ao consumo de pescado comparados com o presente estudo (músculo de <i>G. brasiliensis</i>). Os valores estão apresentados como mg kg ⁻¹ p.s.....	71
Tabela 10 – Valores de referência do nível de exposição máximo diário a metais propostos pela WHO e os valores estimados de ingestão diária no presente estudo para verão e inverno usando as médias obtidas para cada elemento em músculo de <i>G. brasiliensis</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Al – Alumínio

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As – Arsênio

CE – Comunidade Europeia

CEMIG – Companhia Energética de Minas Gerais

Cd – Cádmio

Co – Cobalto

Cr – Cromo

Cu – Cobre

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*; ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

FC – Fator de Condição

Fe – Ferro

GSH – Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona-s-transferase

Hg – Mercúrio

HCl – Ácido Clorídrico

HNO₃ – Ácido Nítrico

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

ICP-MS – *Inductively coupled plasma mass spectrometry*; espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

IHS – Índice Hepatosomático

KBr – Brometo de potássio

km – Quilômetro

LMT – Limite Máximo de Tolerância

Mn – Manganês

m – Metro

mg – Miligrama

mmol – Milimol

MRC – Material de referência certificado

MS – Ministério da Saúde

MT – Metalotioneína

NaCl – Cloreto de Sódio

Ni – Níquel

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pb – Chumbo

pH – Potencial hidrogeniônico

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

PTDI – *Provisional Tolerable Daily Intake*;

PUC – Rio – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

RBC – Rede Brasileira de Calibração

Rb – Rubídio

Se – Selênio

Ti – Titânio

Tris – 2-amino-1-hidroximetil-1,3-propanodiol

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V – Vanádio

Zn – Zinco

μL – Microlitro

μmol – Micromol

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	17
1.1 - Poluição ambiental aquática	18
1.2 - Biomonitoramento e biomarcadores	20
1.3 - Os peixes como bioindicadores de contaminação ambiental	21
1.4 - A bÍlis como bioindicadora de contaminação ambiental	22
1.5 - Metais e ametais como contaminantes ambientais	24
1.6 - Estresse oxidativo	25
1.7 - Biomarcadores de contaminação por metais e de estresse oxidativo	26
1.8 - Efeitos de contaminação ambiental em parâmetros morfométricos pÍscinos	30
2 – OBJETIVOS	32
2.1 - Objetivo geral	32
2.2 - Objetivos EspecÍficos	32
3 – MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1- Área de Estudo	33
3.2 - EspÍcie estudada	37
3.3 - Coleta e disseccão dos peixes	40
3.4 - Cálculo do ÍndiceHepatossomático e Fator de Condição	43
3.5 - Preparo das amostras para posteriores análises	43
3.5.1 - Quantificação de metais	43
3.5.2 - Extração e quantificação de metalotioneÍnas	44
3.5.3 - Extração e quantificação de Glutaciona reduzida	45
3.6 - Análises estatÍsticas	48
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 - Análises morfométricas	49
4.2 - Metais	50
4.3 – MetalotioneÍna	54
4.4 - Glutaciona reduzida	55

4.5 - Caracterização do status alimentar através da análise das cores da bÍlis	56
4.6 - Fator de Condição e Índice Hepatosomático	59
4.7 - Correlações estatísticas e comparações entre matrizes analisadas	62
4.7.1 - Correlações estatísticas nas matrizes analisadas	62
4.7.2 - Comparações entre as matrizes fÍgado e bÍlis	65
4.8 - Consumo humano	70
5 – CONCLUSÕES	74
6 – FUTURAS ETAPAS	75
7 – REFERÊNCIAS	76

1 – Introdução

Os ecossistemas alteram-se naturalmente por ação físico-química ou biológica desde o momento em que são formados, de forma direta ou indireta e em de diferentes tipos de compartimentos. Todavia, deve-se atentar para o fato que o planeta vem sofrendo forte ação antrópica, sendo duramente castigado e deteriorado em prol do desenvolvimento pós-revolução industrial (BASTOS, 2006).

A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola e os derrames acidentais de lixos químicos e esgotos domésticos lançados em rios e mares, somados aos fatores naturais, contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos. A biota aquática está, portanto, constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão (Figura 1) (BASTOS, 2006; ARIAS *et al.*, 2007; ESTEVES *et al.*, 2008).



Figura 1 – Diferentes tipos de contaminação aquática

Neste contexto encontramos as lagoas costeiras, que são ambientes aquáticos encontrados ao longo da linha da costa, localizados na interface entre ambientes costeiros adjacentes e o meio marinho. De acordo com DOMINGOS *et al.* (2012), as lagoas costeiras constituem 13 a 15% da faixa litorânea em todo o mundo; São sistemas rasos, vulneráveis aos ventos comuns nas áreas litorâneas, que promovem a homogeneidade da coluna d'água; mantêm comunicação permanente ou intermitente com o mar em função da dinâmica de deposição de sedimentos marinhos que controlam a abertura da barra de comunicação com o meio marinho (KJERFVE, 1994).

Lagoas costeiras neotropicais representam ambientes particularmente ameaçados em função de estarem situadas em área urbanizada entre o mar e o continente, recebendo os resíduos produzidos pelas atividades humanas realizadas em seu entorno (SOFFIATI, 1998). Este ecossistema está entre os ecossistemas mais impactados do mundo, tipicamente observados nos países em desenvolvimento (ESTEVEVES *et al.*, 2008), devido ao fato da região neotropical possuir uma das faunas de peixes mais ricas e diversificadas, com cerca de 4.035 espécies descritas e uma estimativa de aproximadamente 6.000 espécies existentes (McALLISTER *et al.*, 1997).

Assim, devido à frequente introdução de substâncias em grande escala ao ambiente aquático, se fazem necessários estudos referentes ao biomonitoramento desses sistemas (MACHADO, 2007).

1.1 – Poluição Ambiental Aquática

O ambiente aquático é altamente complexo e diverso. Ele compreende vários tipos de ecossistemas: rios, lagos, estuários, mares e oceanos. Todos esses ecossistemas são produtos dinâmicos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles.

As propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos podem afetar significativamente a atividade biológica e o impacto dos agentes químicos e outros xenobióticos. A concentração, transporte, transformação e disposição final de um contaminante introduzido no ambiente aquático dependem, principalmente, das propriedades do ambiente e das características do contaminante. As emissões de contaminantes no ar, no solo e primariamente nas águas estão relacionadas aos processos naturais e, principalmente, às atividades humanas (COSTA *et al.*, 2008).

A poluição ambiental aquática é decorrente do desenvolvimento tecnológico e de outras atividades consideradas indispensáveis à vida moderna. Conforme FERREIRA (2006), o crescimento industrial vem gerando nas últimas décadas diversos desequilíbrios sendo atualmente, a poluição do meio ambiente aquático, um dos tipos de poluição mais preocupantes.

A poluição aquática gerada por ações antrópicas acrescenta substâncias e energia que alteram as características químicas, físicas e biológicas desses ecossistemas. De Lima e colaboradores afirmam que no caso dos ecossistemas aquáticos, o impacto de um poluente será tão maior quanto for sua concentração e a capacidade do compartimento que o recebe em degradá-lo (DE LIMA *et al.*, 2014).

Diferentes são os compartimentos aquáticos suscetíveis à poluição, bem como as substâncias e as fontes capazes de gerar danos. As fontes de poluição podem ser classificadas em pontuais e não pontuais. Dentre as fontes pontuais podemos citar as estações de tratamento de efluentes industriais, redes de esgoto doméstico, derramamentos acidentais e mineração. As emissões de fontes pontuais são mais facilmente detectadas e controladas e, geralmente, resultam em descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'água.

Ao contrário, as emissões de fontes não pontuais são de difícil controle, variam com o tempo e espaço e podem envolver rotas que resultam na deposição parcial dos contaminantes antes deles atingirem os corpos d'água. Um exemplo típico de fonte não pontual é a utilização de pesticidas no solo e das redes de tratamento de efluentes industriais e de esgoto doméstico. Uma vez no ambiente, os contaminantes podem estar sujeitos a uma combinação de processos que podem afetar o seu destino e comportamento.

De acordo com a literatura, as substâncias potencialmente tóxicas podem ser degradadas por processos abióticos e bióticos que ocorrem na natureza. Porém, determinadas substâncias são capazes de persistir no ambiente por longos períodos de tempo. Substâncias resistentes aos processos de degradação, se descartadas de forma contínua, ocasionam acumulação em níveis ambientais suficientes para resultar em toxicidade (COSTA *et al.*, 2008).

Contaminantes de interesse, como metais, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, podem, por exemplo, se adsorver nos sedimentos e, em seguida, ser transferidos para os organismos que os habitam e/ou que se alimentam dele. Os contaminantes então se associam a sítios específicos dos organismos, reagindo de

acordo com suas concentrações na água, nos sedimentos e nos alimentos caracterizando assim a exposição.

Os contaminantes também podem se encontrar solúveis na água, sendo incorporados através da pele ou dos tecidos respiratórios (no caso das brânquias dos peixes), podem ser ingeridos por meio da alimentação e incorporados pelo trato digestório ou adsorvidos no sedimento (COSTA *et al.*, 2008).

No Estado do Rio de Janeiro, a Lagoa Rodrigo de Freitas é um exemplo de um ambiente que vem sofrendo queda na sua qualidade ambiental ao longo das últimas décadas, devido a intervenções antrópicas e alterações urbanísticas que levaram à diminuição da sua área original, dos canais de escoamento de água pluvial e do aumento do lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado em suas águas.

Diversos estudos utilizando sedimentos, algas, peixes e outros indicadores de contaminação relatam as condições de deterioração da qualidade de suas águas (DE LIMA *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2006) foram observados altos teores de mercúrio (Hg) peixes carnívoros (robalo), seguido dos organismos filtradores (cracas). Os resultados obtidos serviram de subsídios para uma ação mais efetiva dos órgãos da saúde pública, no que se refere à liberação ou não do consumo de pescado deste ecossistema, e acrescentam conhecimentos para a comunidade científica relacionada com a vigilância sanitária e ciência de alimentos.

1.2– Biomonitoramento e biomarcadores

O biomonitoramento visa realizar um diagnóstico precoce por meio de mudanças nas respostas fisiológicas de espécies utilizadas como indicadores da qualidade ambiental (DOS SANTOS, 2013)

Organismos bioindicadores são definidos como espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental em diferentes níveis de organização biológica. São amplamente utilizados na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas e vêm sendo aplicados há décadas (ADAMS, 2002; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2005).

Já os biomarcadores, de maneira geral, são as medidas das respostas à exposição aos contaminantes e são cada vez mais usados em estudos de monitoramento ambiental

para a identificação de efeitos deletérios na biota, pois, quando mensurados, podem indicar a presença, os efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação de um compartimento.

Uma questão específica que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos, uma vez que esta é manifestada primeiramente em níveis moleculares, com a indução de sistemas de defesa celular, antes mesmo de surgirem em níveis mais altos causando danos histológicos.

Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Se os mecanismos de defesa dos organismos forem falhos, sua reprodução ou sobrevivência pode ser afetada podendo, eventualmente, acarretar em mudanças a nível populacional/comunidade. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação ambiental (SCHLENK, 1999).

Sendo assim, o desafio inicial do pesquisador ambiental é descobrir qual o biomarcador apropriado para se obter o melhor diagnóstico tendo em vista os muitos tipos de biomarcadores existentes.

Os biomarcadores estão divididos em biomarcadores de efeito, suscetibilidade, de exposição latente e exposição e efeito sendo este último, um dos biomarcadores mais utilizados. Estes biomarcadores não somente indicam a ocorrência da exposição, como também ligam a exposição ao seu efeito, caracterizando-o de forma específica. Existem diversos biomarcadores de exposição à contaminantes ambientais de interesse usados para indicar efeitos de contaminação em ecossistemas aquáticos, por exemplo, a indução de proteínas e enzimas específicas (COSTA *et al.*, 2008).

1.3– Os peixes como bioindicadores de contaminação ambiental

Os organismos aquáticos assimilam os contaminantes a partir da água, sedimentos, e dos alimentos, podendo estes então se acumular no organismo em várias ordens de grandeza acima das concentrações encontradas na coluna d'água, resultando em diversas conseqüências, tanto para a biota quanto para a saúde humana caso ocorra a ingestão destes organismos contaminados (PFEIFFER *et al.*, 1985; CANLI e ATLI, 2003; FERREIRA, 2006).

Os processos de acumulação nos organismos aquáticos envolvem processos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação, onde a primeira está relacionada à pura absorção da substância pelo organismo por meio das superfícies respiratórias e dérmicas, a segunda relacionada à concentração retida no organismo após os processos de assimilação e eliminação do mesmo, e a terceira e mais abrangente inclui todas as rotas de exposição ao contaminante, inclusive a dieta alimentar uma vez que, à medida que se avança nos níveis tróficos, ocorre o aumento da concentração de contaminantes nos tecidos (COSTA *et al.*, 2008).

Este aumento é resultante, principalmente, da acumulação ocasionada pela dieta alimentar ao longo da cadeia trófica e seus efeitos deletérios se propagam pelos demais componentes do ecossistema (COSTA *et al.*, 2008).

Dentre muitos organismos aquáticos, os peixes são reconhecidos como bons bioindicadores de contaminação ambiental e têm atraído interesse em estudos sobre respostas biológicas, fisiológicas e bioquímicas a contaminantes ambientais fornecendo alertas antecipados sobre este tipo de poluição. Estas respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas à contaminação são de grande relevância (ESPINO *et al.*, 2000).

Ao serem expostos a diferentes tipos de contaminantes, os peixes ativam mecanismos bioquímicos desintoxicantes que podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental. A investigação de biomarcadores em peixes aumenta a possibilidade de identificar causas subjacentes aos efeitos tóxicos e nos fornece informações sobre potenciais danos ecológicos nos ecossistemas (ESPINO *et al.*, 2000).

Alguns exemplos de estudos de biomarcadores em peixes incluem a investigação a respeito da indução de proteínas e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. Estas enzimas são induzidas por contato direto com o agente contaminante. Outras enzimas e proteínas são induzidas pelo estresse oxidativo provocado pelo contaminante e estão relacionadas aos processos de destoxificação de metais tóxicos, como a acetilcolinesterase (AChE) e a metalotioneína (MT) (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

1.4 – A bÍlis como bioindicadora de contaminação ambiental

Uma das principais funções do fígado é a formação de bÍlis, que, além de desempenhar papel importante na digestão e absorção de gorduras, ajudando na emulsão

de grandes moléculas de gordura, transformando-as em moléculas menores, serve como meio de excreção de xenobióticos, entre outras substâncias (GUYTON e HALL, 2002; Kierszenbaum, 2004).

A eliminação biliar de xenobióticos foi pouco estudada durante a primeira metade do século XX, porém a partir da segunda metade, com o aparecimento de uma grande variedade de substâncias químicas sintéticas, foi reconhecida a importância da bÍlis como via de excreção destes compostos (Klaasen e Watkins, 1984).

A bÍlis é secretada por meio de células funcionais metabólicas do fÍgado, flui pelos canalÍculos biliares e atinge o ducto hepático. A partir deste momento pode ser liberada diretamente no duodeno e desviada para a vesÍcula biliar onde, em condições normais, encontra-se concentrada por cerca de cinco vezes, podendo chegar a um máximo de 20 vezes (GUYTON e HALL, 2002).

Os sais biliares são importantes componentes da bÍlis. Além destes, a bÍlis contém colesterol, fosfolipÍdios, pigmentos biliares (bilirubina, de coloração amarela, e biliverdina, de coloração verde) e possíveis metabólitos de xenobióticos, provenientes das fases de biotransformação.

A excreção biliar pode oferecer uma solução para analisar estes elementos em organismos marinhos (BUNTON e FRAZIER, 1994; DIJKSTRA *et al.*, 1996). Por exemplo, durante o projeto BEEP (Efeitos Biológicos da poluição ambiental em Marine Ecossistemas Costeiros), realizado em 2001-2002, determinou-se metabólitos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em amostras biliares de três espécies de peixes (*Platichthys flesus*, *Perca fluviatilis* e *Zoarces viviparus*), em quatro áreas distintas no mar Báltico ratificando que, embora ainda sejam poucos os estudos analisando esta matriz ela pode ser usada na identificação da presença de contaminantes (VUORINEN *et al.*, 2006).

Recentemente verificou-se também que muitos metais são excretados pelo fÍgado para a bÍlis. Um exemplo é o cobre (Cu), que é excretado, primariamente, em peixes teleósteos, pela bÍlis (GROSELL *et al.*, 1997), enquanto outros metais, como o zinco (Zn), podem ser excretados tanto pela bÍlis como pelo intestino (HANDY, 1996). Estudos recentes têm demonstrado que diversos outros metais podem também ser excretados nesta matriz (HAUSER-DAVIS, BASTOS, *et al.*, 2012).

1.5– Metais e ametais como contaminantes ambientais

Os metais encontram-se presentes nos sistemas aquáticos por meio de processos naturais e antrópicos, não são degradáveis e tendem a se acumular em organismos vivos, resultando em diversas consequências para a biota, os ecossistemas e a saúde humana (YABE e OLIVEIRA, 1998). Dentre os poluentes ambientais, os metais são de preocupação particular devido aos seus potenciais efeitos tóxicos e à capacidade de bioacumulação em ecossistemas aquáticos (CENSI *et al.*, 2006).

A maior parte dos metais é essencial à vida das plantas e dos animais em diferentes funções biológicas, incluindo Fe, Co, Cu, Zn, Ni, Se, Cr, V, entre outros - são assim denominados essenciais ou micronutrientes. Por outro lado, em altas concentrações, todos esses metais produzem efeitos adversos ao funcionamento dos organismos, podendo causar intoxicação.

Alguns elementos como o As, Cd, Pb, Hg e o Al não possuem função biológica ou a possuem de forma limitada e são geralmente tóxicos – são denominados não-essenciais ou micro-contaminantes ambientais.

Muitos elementos são regularmente absorvidos através da dieta (alimentos e água) e inalados junto com o ar respirado. Dessa forma, podem ocorrer quantidades variáveis desses elementos que se depositam na biota, podendo ser absorvido pelo homem através da dieta e do ar (SELINUS, 2006).

Metais têm sido associados a fontes de outros contaminantes, como por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) que atualmente se encontram presentes no meio ambiente de todo o planeta advindos por meio de derrames acidentais de óleo, processamentos de petróleo, despejos domésticos e industriais, drenagens pluviais urbanas, queima intencional de madeiras e plantações, combustão incompleta de óleo combustível automotivo, além dos processos naturais como a própria estrutura dos solos e os processos de erosão (MENICONI, 2007).

Os metais podem desnaturar proteínas e inativar enzimas e alterar as atividades celulares prejudicando suas funções. Além dos efeitos tóxicos causados pelos metais em si, estes contaminantes também são reconhecidos como agentes causadores de estresse oxidativo, pois estimulam a produção de radicais livres por meio da combinação com radicais hidroxila (OH) ou outros radicais reativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; DE JESUS e DE CARVALHO, 2008).

1.6– Estresse oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica. O oxigênio no seu estado molecular (O_2) é substância essencial para muitos processos metabólicos vitais, porém, seu caráter birradical admite reações de oxidação e redução possibilitando, dessa forma, a formação de radicais livres e substâncias conhecidas como espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como EROs (BARBOSA *et al.*, 2010; CONDESSA, 2014). As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, como por exemplo os radicais superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot).

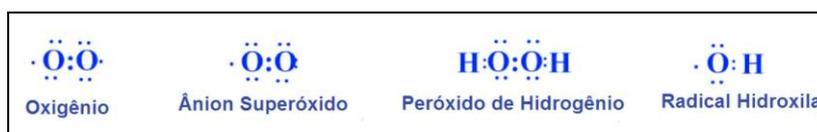


Figura 2 – Exemplos de espécies reativas de Oxigênio - ERO

Em concentrações fisiológicas, as EROs possuem funções biológicas no organismo e encontram-se envolvidas no processo de produção de energia, fagocitose, sinalização intercelular, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas consideradas importantes, porém, quando encontradas em quantidades excessivas podem apresentar efeitos prejudiciais, induz o estresse oxidativo tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos das membranas, às enzimas, aos carboidratos e DNAs encontrando-se associadas a várias patologias (BARREIROS e DAVID, 2006).

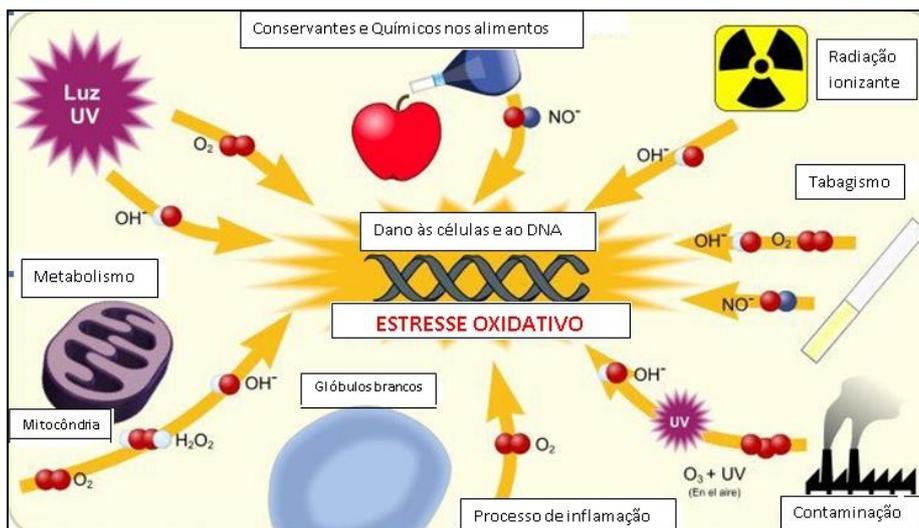


Figura 3 – Causas de estresse oxidativo

A presença excessiva destes radicais livres induz o estresse oxidativo. Esse tipo de estresse se caracteriza pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, quando os mecanismos de defesa das células não conseguem atuar sobre a presença excessiva de radicais livres ou seus efeitos deletérios (RAMOS *et al.*, 2000). A peroxidação de lipídios, por exemplo, é induzida a partir das EROs e do estresse oxidativo gerado por elas, e altera a homeostasia de diversos minerais essenciais, causando danos ao DNA (BARREIROS e DAVID, 2006).

1.7– Biomarcadores de contaminação por metais e de estresse oxidativo

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000), *“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”*.

O sistema de defesa antioxidante, enzimático ou não enzimático, é um processo de sinalização redox que inibe o estresse oxidativo e limita o excesso da síntese de EROs (DROGE, 2002). Dentre as defesas enzimáticas, tem-se a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione S-transferase (GST), a Glutathione Peroxidase

(GPx), a Glutathiona reduzida (GSH), a Glutathiona Redutase (GR) e a Glicose-6-fosfatase desidrogenase (G6PDH). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, temos o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), a Glutathiona reduzida (GSH) e a Glutathiona total (GSH-eq) (HERMES-LIMA, 2004).

A GSH (Figura 1) possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Ela é um tripeptídeo rico em grupamento tiol e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol presente na cisteína.

Este grupamento atua como captador de espécies reativas de oxigênio e metais, servindo como substrato em reações de redução-oxidação, especialmente os íons de Cádmio (Cd) (DAMASCENO *et al.*, 2002). Em diversos estudos, a quantificação da GSH em peixes tem sido utilizada como proteína biomarcadora de estresse oxidativo em relação à presença de contaminantes, como hidrocarbonetos e metais (HAUSER-DAVIS, 2008).

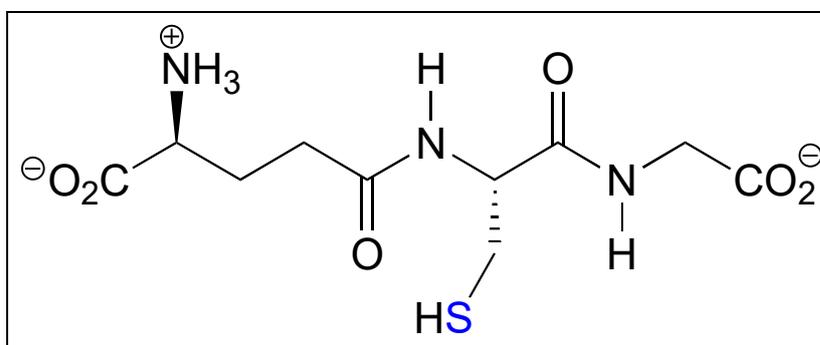


Figura 4 – Estrutura molecular da Glutathiona reduzida (GSH)

Neste contexto, diversos estudos relacionados ao estresse oxidativo em peixes já foram realizados. Por exemplo, a GSH apresentou resultados importantes quanto ao seu papel no estudo de VIARENGO e colaboradores (1997). No estudo em questão, a exposição de fígados de peixe a concentrações molares de Cu^{2+} , Hg^{2+} e $^+\text{CH}_3\text{Hg}$ diminuiu significativamente a atividade Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD, do inglês *Ethoxyresorufin-O-deethylase*), enquanto a adição de concentrações fisiológicas de GSH restauraram imediatamente a atividade catalítica dessa enzima.

Estes resultados demonstram que a atividade EROD no fígado de peixe é altamente sensível a concentrações extremamente baixas de metais e sugerem também o papel fundamental da GSH como uma primeira linha de defesa contra a citotoxicidade em metais. Já LUNARDELLI e MARTINEZ (2009) realizaram a exposição de peixes ao alumínio (Al). Após 6h de exposição “*ex situ*”, os indivíduos apresentaram aumento significativo na atividade da catalase e redução significativa no conteúdo renal de GSH, que persistiu até a 24ª hora de exposição. Após 24h houve também aumento da peroxidação lipídica.

Tais resultados indicam que o Al promove alterações bioquímicas no tecido renal de *P. lineatus*, capazes de desencadear estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram encontrados em peixes contaminados com piretróides.

A exposição a deltametrina em *Channa punctatus* durante 48 h acarretou na indução de várias enzimas antioxidantes e anti-oxidantes não-enzimáticas no rim e no fígado dos espécimes, dentre elas a GSH, que apresentou-se induzida de forma significativa em todos os tecidos (SAYEED *et al.*, 2003). O aumento nos níveis de atividade de GSH no fígado (81%), rim (83%) e coração (53%) de *Clarias gariepinus* coletados no rio Ogun, Sul da Nigéria, também demonstraram que a presença de metais pode provocar estresse oxidativo (FAROMBI *et al.*, 2007).

Já as metalotioneínas (MTs), primeiramente identificadas em cavalos em 1957 (Figura 2), têm sido alvo de intensa investigação quanto à sua função até os dias atuais.

Assim como a GSH, inicialmente também foram identificadas pela sua capacidade de ligação ao Cd. Compreendem uma família de proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa), termo resistentes, que possuem elevada afinidade por íons metálicos dos grupos IB e IIB da tabela periódica.

Sabe-se que essas proteínas apresentam uma composição de aminoácidos peculiar caracterizada por um grande grupo de cisteínas (até 30% do total teor de aminoácido) que servem como ligantes para os metais (PALMITER, 1998; ALBUQUERQUE, 2007; VIARENGO *et al.*, 2007).

Estas metaloproteínas exercem funções relacionadas à proteção tecidual, sendo por isso, consideradas “*housekeepers*” (mantenedoras) do ambiente celular (HAMER, 1986). Entretanto, a importância de sua ação para a célula e o mecanismo molecular pelo qual essa função é exercida ainda não foram completamente elucidadas (PALMITER, 1998).

Estudos sugerem que sua presença está diretamente relacionada como uma consequência da exposição a metais, tanto em peixes, bem como em mexilhões e em outros organismos sendo, por conseguinte, considerada como um indicador de contaminação por metais amplamente utilizado como ferramenta em programas de biomonitoramento (PALMITER, 1998; VIARENGO *et al.*, 2007).

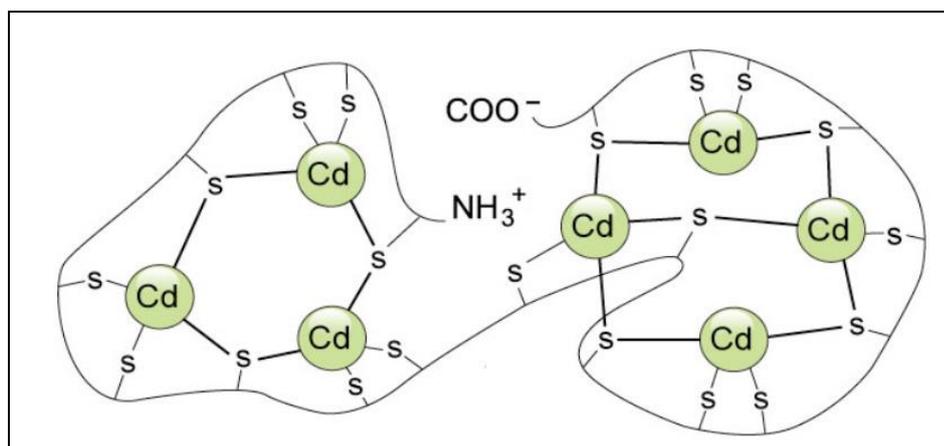


Figura 5 – Estrutura molecular da Metalotioneína (MT) (adaptado de http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochemie/UVED/site/html/2/2-3/2-3-3/2-3-3-5.html).

As funções biológicas da MT envolvem a destoxificação e a homeostase do organismo, representando uma resposta específica de exposição aos metais como Cu, Zn, Cd e Hg. Elas servem como reservatórios de metais essenciais, impedindo ou retardando seu poder de toxicidade e doando estes metais à medida que são sintetizadas, ou após sua síntese (PALMITER, 1998). Além disso, os níveis de MT, ao serem induzidos por íons metálicos, podem variar segundo a espécie, tecido e condições experimentais.

Muitos estudos, principalmente em peixes ósseos, vêm sendo realizados nos últimos anos acerca da utilização dessas proteínas como biomarcadores específicos de contaminação por metais. Atualmente a MT é um dos principais biomarcadores em peixes estando estabelecida por programas de monitoramento desenvolvidos e implementados na comunidade europeia (Hauser-Davis, Gonçalves, *et al.*, 2012).

A MT em peixes é usualmente mensurada no fígado, pois este é o principal órgão detoxificante do corpo, porém sua presença foi recentemente reportada na bÍlis, seguindo a mesma tendência das metalotioneínas no fígado, demonstrando que este fluido biológico possui alto potencial como biomarcador de exposição a metais (HAUSER-DAVIS, BASTOS, *et al.*, 2012).

Como o fígado e a bÍlis estão intrinsecamente ligados, é interessante também analisar esta metaloproteína neste fluido biológico na busca por respostas rápidas a contaminação ambiental, já que o fígado demora mais a expressar respostas à contaminação.

1.8 – Efeitos de contaminação ambiental em parâmetros morfométricos piscinos

Estudos pretéritos já observaram a influência da contaminação ambiental nos parâmetros morfométricos de diversas espécies de peixe ao redor do mundo. Parâmetros como o Índice Hepatosomático (IHS) e o Fator de Condição (FC) podem demonstrar mudanças no metabolismo dos peixes, indicando possíveis efeitos causados por contaminantes (HAUSER-DAVIS, 2008).

Segundo BRAGA (1986), o FC é um índice muito utilizado em estudos de biologia pesqueira, pois indica o grau fisiológico do peixe frente ao meio em que vive e deve permanecer constante, independente do tamanho que o peixe possa vir a ter, em um determinado período. Seu uso implica alterações de bem estar das populações de peixes ao longo de um determinado período de tempo (GOMIERO e BRAGA, 2003).

De acordo com MAYER *et al.* (1992), o fator de condição identifica momentos de reserva de energia e a capacidade do animal em tolerar agentes tóxicos e/ou outras interferências a que esteja submetido.

Estudos relacionados ao FC *versus* poluentes têm sido divergentes, sendo necessário um maior esforço para desvendar esta relação entre eles. Alguns estudos indicam que não há diferenças significativas entre os FC de locais contaminados por metais (DETHLOFF *et al.*, 2001; LOHNER *et al.*, 2001), enquanto outros indicam que peixes de locais impactados por metais apresentaram FC inferior aos peixes de locais menos contaminados (HAUSER-DAVIS, LAVANDIER, *et al.*, 2012)

Da mesma forma, buscando um maior entendimento sobre os possíveis danos causados pelos contaminantes aquáticos, o IHS é outro parâmetro, que, juntamente com o FC tem sido utilizado como indicador de estresse ambiental. De acordo com o estudo de QUEROL e colaboradores (2002), o IHS parece estar relacionado com a mobilização e o acúmulo de reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogenese, reprodução ou preparação para o período de inverno. Porém, de acordo com POWERS

et al. (1989), este parâmetro nem sempre pode ser considerado um índice confiável para avaliar o estado nutricional pois pode ser influenciado por outros fatores fisiológicos, como reprodução e doenças. O IHS pode ainda ser observado como um parâmetro indicativo da ocorrência de distúrbios e estresse hepático em peixes expostos diretamente à contaminação ambiental (HAUSER-DAVIS, LAVANDIER, *et al.*, 2012).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Investigar determinados metais e a expressão de metaloproteínas biomarcadoras de exposição aos metais e de estresse oxidativo em diferentes matrizes (bílis, fígado e músculo) de peixes de uma região neotropical exposta à contaminação ambiental.

2.2 - Objetivos Específicos

- Coletar peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas realizando coletas sazonais (verão, inverno);
- A partir das coletas, quantificar proteínas indicadoras de estresse oxidativo (Glutathiona reduzida - GSH) e de desintoxicação de metais (Metalotioneína - MT) por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) em diferentes matrizes dos peixes coletados (fígado, músculo e bÍlis);
- Determinar as concentrações de metais nas diferentes matrizes (bÍlis, fígado e músculo) por espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS);
- Correlacionar por meio de análises estatísticas os parâmetros morfométricos dos peixes, e as concentrações de GSH, de MT e de metais nas diferentes matrizes analisadas;
- Realizar análises estatísticas multivariadas a partir dos parâmetros morfométricos, e das concentrações de GSH, MT e de metais nas diferentes matrizes e estações analisadas.

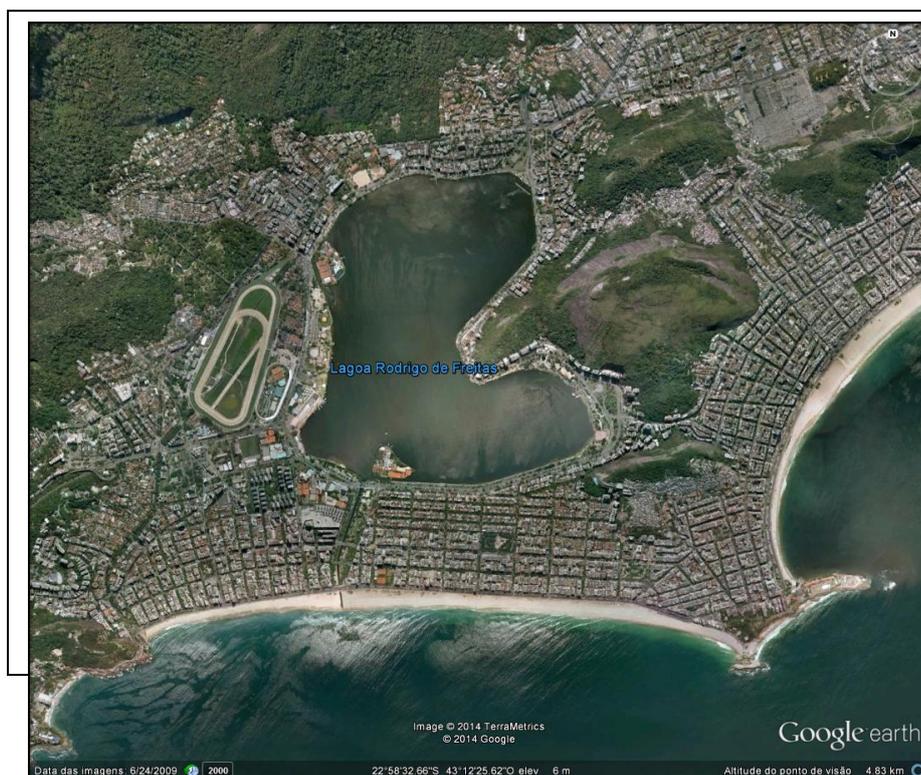
3 – Material e Métodos

3.1 - Área de Estudo

O local escolhido para o presente trabalho foi a Lagoa Rodrigo de Freitas. A região foi selecionada por ser uma área de pesca e lazer extremamente importante no cenário político, sócio e econômico da região do Rio de Janeiro.

A Lagoa Rodrigo de Freitas (Figura 6), assim como outras lagoas neotropicais, provavelmente teve sua origem associada à inundação da planície costeira devido ao aumento do nível do mar durante a transgressão marinha do quaternário (ESTEVES *et al.*, 2008). A Lagoa Rodrigo de Freitas, assim como outras formações na costa do litoral circunvizinho, se originou aproximadamente há 6.000 anos, pelo desenvolvimento de cordões arenosos regressivos que terminaram por isolar essa massa de água (DOMINGOS *et al.*, 2012).

Localizada na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°57'75" S e 22°58'82" S e as longitudes 43°11'90" O e 43°12'11" O, a Lagoa Rodrigo de Freitas compreende uma área de aproximadamente 2,2 Km², perímetro aproximado de 7,5 Km e, segundo estudo realizado por ANDREATA e colaboradores (2012), sua profundidade máxima pode alcançar até 11 metros de profundidade.



Isolada do mar pelas praias de Ipanema e Leblon, a Lagoa se comunica com o mar através de um único canal, o Jardim de Alah, situado na sua parte sul. Este canal tem 835 metros de comprimento, largura atual de 9,8 metros e 0,7 metros de profundidade. É dragado constantemente para evitar seu assoreamento, já que o mar deposita areia em sua foz.

Em dias de mar agitado e de marés de sizígia a Lagoa Rodrigo de Freitas é capaz de trocar grande quantidade de águas com o oceano, fenômeno que contribui para uma renovação periódica da água e dos animais que lá habitam (BASTOS, 2006; DOMINGOS *et al.*, 2012).

Os sucessivos aterros que se deram às suas margens diminuíram em cerca de 1/3 a área ocupada pelo espelho d'água para dar lugar às novas construções para ocupação humana. Embora as águas da Lagoa sejam predominantemente salobras, atualmente constata-se uma influência marinha ainda menor do que as registradas no passado. Dois motivos podem ser estabelecidos para isto: o grau de assoreamento mais intenso do canal, acarretando uma baixa eficiência no aporte de água salgada, e o maior aporte de água doce proveniente do extravasamento dos rios tributários em função de uma maior incidência de chuvas na região e da urbanização da área no entorno eliminando pontos de infiltração das águas hoje coletadas pela rede de águas pluviais que deságuam diretamente na mesma (LOUREIRO *et al.*, 2011).

Uma das mais importantes atividades na Lagoa Rodrigo de Freitas é a pesca artesanal. Segundo levantamentos realizados em 2003, dentre os pescadores que praticam este tipo de pesca na lagoa, 34 são cadastrados e vinculados à Colônia de Pescadores (Figura 7) e aproximadamente 80% vive exclusivamente da pesca (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2003).

Semanalmente são capturados, em média, 500 quilos de pescado no inverno e 2.000 quilos de pescado no verão. A estimativa de captura corresponde a 60 % de tainha e acarás e 20% de robaleta, robalo e siri (FERREIRA, 2006).



Figura 7 - Colônia de Pescadores na Lagoa Rodrigo de Freitas

A composição ictiofaunística da Lagoa Rodrigo de Freitas é característica. Apresenta espécies dulcícolas, marinhas e, principalmente, espécies que toleram uma grande variação do gradiente de salinidade (ANDREATA *et al.*, 2004).

A Lagoa Rodrigo de Freitas é regulamentada como Área de Proteção Permanente pela Lei Orgânica do Município do Rio de Janeiro conforme artigo 463. A relevância de seu estudo consiste no fato dela ser um ponto turístico e de lazer de grande expressão na estrutura urbana da cidade do Rio de Janeiro, e refletir antigos problemas de saneamento que ao longo desta última década vem se caracterizando por um substancial aumento de problemas de natureza físico-ambiental (ALVES *et al.*, 1998).

Uma lagoa é por sua natureza um ecossistema frágil, suscetível às ações naturais, porém nos últimos séculos a Lagoa Rodrigo de Freitas sofreu uma forte ação antropogênica, que vem acelerando os processos naturais de degradação ambiental da área (MARCA e ANDREATA, 2001). O crescente processo de urbanização da cidade do Rio de Janeiro, com constantes despejos de rejeitos dos postos de gasolina e do Jóquei Clube e as ligações clandestinas de esgoto “*in natura*” na rede pluvial durante décadas sem controle, contribuíram para a deterioração do ecossistema e a modificação completa de suas características.

Estudos pretéritos na Lagoa Rodrigo de Freitas definiram o estoque de metais na camada de lama no fundo da lagoa e mostrou que existe uma séria contaminação por metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) comparados com valores internacionais. Os HPA estão associados à poluição por derivados do petróleo, incluindo óleos lubrificantes. (LOUREIRO, 2004).

Também no ano de 2004, a antiga Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente - FEEMA (atual INEA), objetivando fazer um levantamento dos postos do Rio de Janeiro que ainda não possuíam licenciamento ambiental, constatou que, dos 12 postos fiscalizados, apenas 05 solicitaram licenciamento ambiental na FEEMA e todos apresentaram irregularidades em sua estrutura, como combustível em fase livre (solto no lençol freático), falta de manutenção na caixa separadora de óleo e água, possibilitando o vazamento de combustível na rede de águas pluviais além de problemas de explosividade (BASTOS, 2006).

A concentração de postos nestas áreas aumenta ainda mais o risco de contaminação das águas subterrâneas por compostos aromáticos, hidrocarbonetos oxigenados, íons metálicos, microrganismos e compostos nitrogenados (DA SILVA, 2004).

Em um estudo realizado em 2013, FONSECA indicou que o grande acúmulo de matéria orgânica, principalmente de compostos húmicos, é determinante nos processos geoquímicos atuantes na Lagoa, sendo observada influência direta e determinante dos compostos húmicos sobre o fracionamento químico dos metais.

Estes, principalmente nos casos do Cu, Pb e Zn, se apresentaram aprisionados à fase orgânica, tornando-os indisponíveis para as comunidades bacterianas (DA FONSECA *et al.*, 2013).

Dessa maneira, alterações nas condições físico-químicas no ambiente podem liberar grande quantidade de metais para assimilação pelos organismos. Tal fato pode ser observado em um evento de dragagem, onde foi possível observar a ressuspensão dos metais e os efeitos causados no ambiente (LOUREIRO *et al.*, 2008).

Em 2012, por meio de novos estudos, LOUREIRO *et al.* concluíram que as alterações na dinâmica da lagoa causadas pela intensa ocupação humana na bacia de drenagem a partir da década de 20, provocaram uma redução nos níveis de energia do sistema e mudanças nas condições físico-químicas, bem como as atividades antropogênicas no seu entorno nas camadas sedimentares mais recentes.

Outras alterações recentes também modificaram as concentrações dos metais no ambiente. A Lagoa apresenta-se poluída por Pb, Cu, Zn e Ni quando comparados com os valores padronizados pelos Estados Unidos e Canadá (LOUREIRO *et al.*, 2012).

Outros estudos realizados na Lagoa Rodrigo de Freitas utilizaram as florações fitoplânctônicas como descritoras de condições antecedentes aos eventos de mortalidade de peixes, evento muito comum neste ambiente aquático. Este estudo aponta uma

construção de um sistema de alerta para o risco de acidentes com a ictiofauna, juntamente com outras variáveis descritoras da qualidade da água (GUPTA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012) em seu estudo com microcistinas (MCs), hepatotoxinas produzidas por cianobactérias, consideraram a exposição à esse contaminante como um grave risco tanto para a saúde dos animais quanto para a saúde de seres humanos, que podem ingerir este alimento contaminado (RODGER *et al.*, 1994; WOOD *et al.*, 2009; BERRY *et al.*, 2011)

Em 2013, um estudo realizado por DA FONSECA *et al.* indicou o fracionamento dos metais nos sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas assim como identificou a influência da matéria orgânica na dinâmica de partição.

De acordo com os resultados, as análises indicaram a matéria orgânica como um importante agente ligante. Características peculiares como sedimentos redutores, altas concentrações de metais e granulometria fina transformaram este ecossistema em um depósito efetivo de metais, onde os mesmos não se apresentam em frações facilmente remobilizáveis (DA FONSECA *et al.*, 2013).

3.2 - Espécie estudada

A espécie *Geophagus brasiliensis* (Figura 8), popularmente conhecida como acará, cará ou papa-terra, faz parte da família Cichlidae, um dos maiores grupos de peixes teleósteos, compreendendo mais de 1.400 espécies (BENINÇÁ, 2006).

Os ciclídeos são onívoros e possuem hábitos muito diversificados. A dieta diversificada composta predominantemente por vegetais, detritos, sedimentos, invertebrados aquáticos, larvas de inseto e escamas de peixe, caracteriza um forrageamento diversificado de *G. brasiliensis* sobre recursos alimentares bentônicos (ABELHA e GOULART, 2004)



Figura 8 – Espécime de *Geophagus brasiliensis*, Lagoa Rodrigo de Freitas, 2014.

A distribuição natural da espécie *Geophagus brasiliensis* está restrita à América do Sul, América Central, África e Índia (LOWE-MCCONNELL, 1975; KULLANDER, 2003).

No Brasil é uma das espécies mais comuns, estando distribuída desde a costa leste à costa sul do país. É bem adaptada ao clima tropical, possui elevada capacidade de adaptação a ambientes lânticos e elevadas abundâncias em lagos e reservatórios do Estado do Rio de Janeiro. É um peixe de pequeno porte atingindo uma média de 25 cm, podendo ser considerado adulto a partir dos 18 cm de comprimento (ROLLA *et al.*, 2003; HAUSER-DAVIS, 2008).

Geophagus brasiliensis não é uma espécie migradora, sua fecundação é externa e a desova parcelada, ocorrendo ao longo de vários meses do ano (FERREIRA, 2013). O período reprodutivo é marcado pela formação de casais que constroem ninhos e depositam os ovos fertilizados sobre o substrato e se dá entre o final do verão e início do outono (KULLANDER, 2003).

Sua classificação taxonômica é dada por:

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Osteichthyes

Subclasse Actinopterygii

Subdivisão Teleostei

Ordem Perciformes

Família Cichlidae

Gênero *Geophagus* Heckel, 1840

Espécie *Geophagus brasiliensis* Quoy e Gaimard, 1824

A espécie *Geophagus brasiliensis* é considerada por alguns autores como um ótimo modelo para estudar os danos causados pelo efeito dos poluentes constantemente encontrados em ambientes aquáticos. A utilização da espécie como bioindicadora de efeitos dos contaminantes ambientais é explicada pelas suas características biológicas, como por exemplo, o fato desta espécie não ser migratória, podendo caracterizar bem a contaminação de seu habitat, por ser uma espécie endêmica, de fácil captura, comercializado para consumo humano, além de levar em conta sua alimentação constituída também por sedimento, onde muitas substâncias químicas se depositam (BENINÇÁ, 2006).

Segundo estudos anteriores, o peixe acará está entre os mais numerosos das espécies de consumo encontrada no rio Paraíba do Sul, no trecho fluminense (ARAÚJO *et al.*, 2001). De acordo com o exemplo abaixo da Figura 9, não é difícil encontrar seu comércio em bares e restaurantes.



Figura 9 – Fotografia demonstrando o consumo da espécie *Geophagus brasiliensis* em restaurante de Niterói – RJ (Acervo pessoal - Sylvia Nogueira)

Desta forma, a espécie *Geophagus brasiliensis* foi escolhida como biomonitor para este estudo devido ao seu endemismo e abundância, o que proporciona uma fácil

captura além de levar em conta sua alimentação constituída também por sedimento, onde muitos contaminantes se depositam.

Outros fatores relevantes para a escolha da espécie foram o seu consumo pela população, sendo caracterizada como uma espécie de importância econômica, a facilidade de manipulação em laboratório quanto à visualização e retirada dos órgãos necessários para o estudo além da presença da vesícula biliar. Ressalta-se que nem todas as espécies de peixes possuem esta estrutura.

3.3 - Coleta e dissecação dos peixes

Os peixes foram capturados através de redes de arrasto, imediatamente acondicionados em isopores contendo gelo e levados, ainda vivos, para o laboratório na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC-Rio. As coletas foram realizadas nos dias 18 de Março de 2014 (coleta de verão/N=17) e 11 de Setembro de 2014 (coleta de inverno/N=20).

A espécie foi identificada de acordo com a literatura especializada (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978; CARVALHO-FILHO, 1999; NELSON, 2006) e correlacionada ao sítio Fishbase (www.fishbase.org.br) que possui informações acuradas e completas extraídas de artigos científicos, sendo muito utilizado nas identificações taxonômicas de inúmeros trabalhos.

Após identificação, foi realizada a pesagem e a medição do comprimento total dos indivíduos coletados (que corresponde à distância da ponta do focinho até a maior extremidade da nadadeira caudal). Através destas medidas é possível calcular o Índice Hepatosomático (IHS) e o Fator de Condição dos peixes, descritos na próxima seção. As medidas foram realizadas com o auxílio de um ictiômetro calibrado pela Rede Brasileira de Calibração (RBC). Para a pesagem foi utilizada uma balança analítica (MARTE®) também calibrada de acordo com a RBC.

Quando possível, foi realizada a sexagem dos exemplares, utilizando a escala a seguir, descrita por VAZZOLER (1981), para identificar os estágios de maturação gonadal dos peixes capturados:

a) Imaturo: os ovários são muito pequenos, filamentosos, translúcidos e sem sinal de vascularização; não se observam ovócitos a olho nu. Os testículos também se encontram reduzidos, filamentosos e com posição semelhante à dos ovários;

b) Em maturação: os ovários se tornam maiores, ocupando de 1/3 a 2/3 da cavidade abdominal, intensamente vascularizados. A olho nu observa-se ovócitos opacos, pequenos e médios. Os testículos também se apresentam desenvolvidos, com forma lobulada.

c) Maduro: os ovários aparecem túrgidos, ocupam de 2/3 a praticamente toda a cavidade abdominal, sendo visível um grande número de ovócitos grandes opacos e/ou translúcidos, cuja frequência varia de acordo com o grau de maturação sexual da espécie. Os testículos também aparecem túrgidos, ocupando quase que totalmente a cavidade abdominal.

d) Esvaziado: os ovários apresentam-se flácidos, com membranas distendidas de tamanho relativamente grande, mas não volumosos, ocupando menos da metade da cavidade abdominal. Observam-se poucos ovócitos em estado de absorção, podendo formando glóbulos esbranquiçados. Há a presença de zonas hemorrágicas bem visíveis, com os vasos sanguíneos dilatados. Os testículos também se apresentam flácidos, com aspecto hemorrágico.

e) Em repouso: os ovários se apresentam reduzidos, ocupando cerca de 1/3 da cavidade abdominal, porém sendo claramente maiores que os imaturos. São translúcidos, com fraca vascularização, não se observando ovócitos a olho nu.

A retirada dos órgãos fígado e músculo (Figura 10) foi realizada com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Foi realizada uma incisão na face ventral do indivíduo iniciada no poro urogenital e terminada nos rastros branquiais (Figura 10). Os órgãos foram acondicionados em tubos de polipropileno estéreis e congelados em freezer a -20 °C.

Após localizar a vesícula biliar (Figura 11), as bílis dos espécimes foram removidas com o auxílio de seringas de 03 mL, acondicionadas em microtubos estéreis com capacidade para 02 mL e armazenadas em freezer a -20 °C. O volume de bílis e sua coloração foram anotados para futuras referências e discussões a respeito do *status* alimentar dos animais.

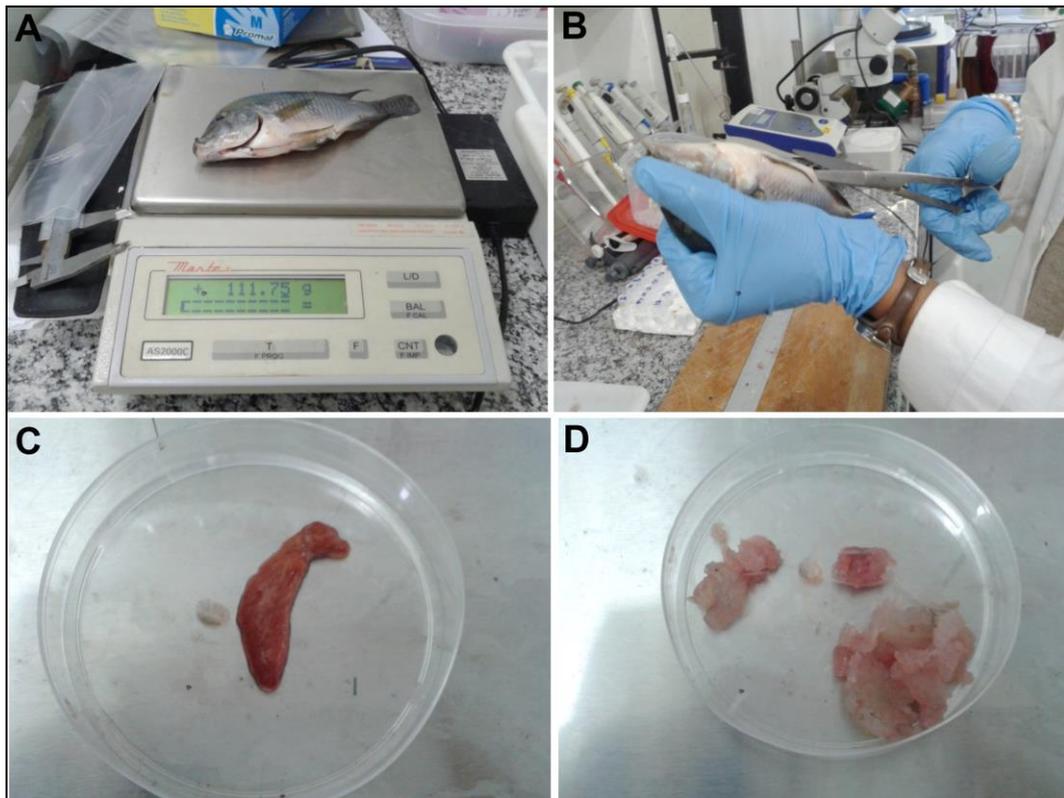


Figura 10 - Pesagem (A) e disseção (B) de fígado (C) e músculo (D) em espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados no presente estudo.

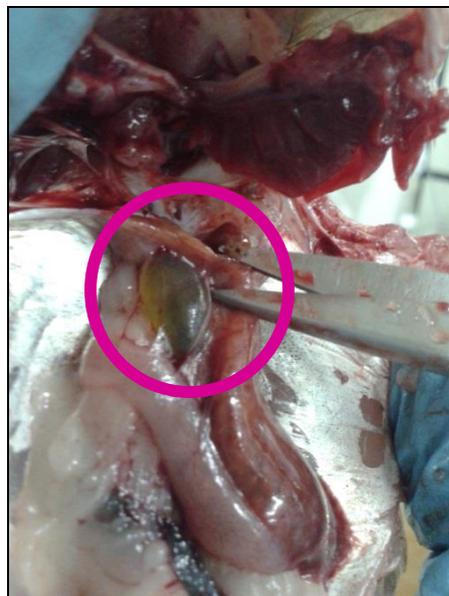


Figura 11– Localização da vesícula biliar em espécime de *Geophagus brasiliensis* coletado no presente estudo.

3.4 - Cálculo do Índice Hepatosomático e Fator de Condição

O Índice hepatossomático (IHS) e o Fator de Condição foram calculados de acordo com Vazzoler (1981), da seguinte forma:

$$\text{IHS} = 100 \frac{W_F}{W_T}; \text{ onde } W_f = \text{ peso do fígado (g) e } W_T = \text{ peso total do peixe (g);}$$

$$F_C = 100 \frac{W_T}{L_T^3}; \text{ onde } W_T = \text{ peso total do peixe (g) e } L_T = \text{ comprimento total do peixe}$$

(cm).

3.5 - Preparo das amostras para posteriores análises

As amostras de músculo e fígado foram liofilizadas por 48 h (Liotop 101, Liobrás, SP, Brasil) e, subsequentemente, maceradas com auxílio de pistilo em cadinho de porcelana até completa homogeneização. As amostras de bÍlis foram apenas congeladas, sem preparos especiais.

3.5.1 - Determinação de metais

Foram pesados aproximadamente 100 mg de cada amostra seca de amostra de tecido em tubos de polipropileno estéreis e em seguida foi adicionado 1,0 mL de HNO₃ subdestilado.

Os brancos foram preparados em duplicata, apenas com 1,0 mL de HNO₃ subdestilado. O Material de Referência Certificado (MRC) utilizado foi o DORM-4 (Músculo de peixe-cão – Dogfish muscle - National Research Council, Canadá).

Foram pesados 250 mg de Dorm-4 em tubos de polipropileno estéreis e adicionados 2,5 mL de HNO₃ subdestilado. As amostras, os brancos e os MRC foram deixados em descanso (por aproximadamente 12 horas, *overnight*) e então aquecidos em bloco digestor durante 4 horas, em sistema fechado a aproximadamente 100 °C, sendo fiscalizadas de hora em hora, com alívio manual da pressão por rápida abertura das tampas no caso de tampas inchadas. Este procedimento evita que a alta pressão do

interior dos tubos ocasione o rompimento das tampas, com possível perda de amostra, prejudicando assim o experimento.

Após as 4 horas, a limpidez das amostras, dos brancos e dos MRC foi avaliada e, sendo satisfatória, as amostras e os brancos foram avolumados com 10 mL de água ultra pura, (resistividade > 18MΩ) e os MRCs avolumados a 25 mL.

A quantificação dos metais foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Nas determinações realizadas, utilizou-se ICP-MS ELAN DRC II (Perkin-Elmer Sciex, Norwalk, CT, USA). Durante a análise, ^{103}Rh foi utilizado como padrão interno em concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Resumidamente, o funcionamento do ICP-MS é baseado em seis etapas: a solução é levada através de capilares com o auxílio de uma bomba peristáltica para um nebulizador, garantindo que o fluxo seja contínuo. Dentro da câmara de nebulização as partículas sofrem processo de separação por tamanho da gotícula formada. Seguindo o processo, a amostra passa pelo injetor onde sofre a vaporização e logo em seguida entra no plasma onde são levadas à forma monovalente, aceleradas e selecionadas de acordo com a razão carga massa de cada isótopo. A detecção se dá de acordo com o princípio foto multiplicador com diferença de potencial.

As condições instrumentais do ICP-MS estão descritas a seguir na Tabela 1.

Potência	1.100 W
Vazão de gás principal	$15,0 \text{ L min}^{-1}$
Vazão de gás auxiliar	$1,0 \text{ L min}^{-1}$
Vazão de gás carreador	$0,98 \text{ L min}^{-1}$
Isótopos monitorados	$^{27}\text{Al}, ^{51}\text{V}, ^{53}\text{Cr}, ^{57}\text{Fe}, ^{59}\text{Co}, ^{60}\text{Ni}, ^{65}\text{Cu},$ $^{66}\text{Zn}, ^{75}\text{As}, ^{82}\text{Se}, ^{114}\text{Cd}, ^{202}\text{Hg}, ^{208}\text{Pb}$

3.5.2 - Extração e quantificação de metalotioneínas

As MTs foram extraídas de acordo com o procedimento de extração térmica de ERK, IVANKOVIC *et al.* (2002), onde aproximadamente 50 mg de amostra de tecido foram pesadas e homogeneizadas em aproximados 500 μL de solução tampão contendo

Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,6, fenil-metil-sulfonil-fluoreto como inibidor de proteases a 5 mmol L⁻¹ e β-mercaptoetanol como agente redutor a 0,01 %.

As amostras foram centrifugadas a 20.000 x g em uma centrífuga refrigerada modelo Mikro 220 R (Hettich, Alemanha) durante 60 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram então removidos e transferidos para outros microtubos previamente nomeados e estes aquecidos em banho-maria termostaticado (Kacil, São Paulo, Brasil) a aproximadamente 70 °C durante 10 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 20.000 x g (desta vez durante 30 min) e, após a segunda centrifugação, os sobrenadantes finais contendo as MT foram finalmente separados e as amostras congeladas a -20 °C para análise.

A quantificação da MT foi realizada através do método espectrofotométrico utilizando a reação de Ellman: foram utilizadas 50 µL das amostras contendo as metalotioneínas provenientes da extração térmica, tratadas com 50 µL de solução de HCl 1 mol L⁻¹ contendo EDTA 4 mmol L⁻¹.

Em seguida adicionou-se 1400 µL da solução de NaCl 0,2 mol L⁻¹ contendo 0,43 mmol L⁻¹ de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico tamponado com 0,2 mol L⁻¹ de fosfato de sódio, pH 8,0. As amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos e as absorvâncias das amostras foram lidas em microcubetas de quartzo em um espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer), a 412 nm (ELLMAN, 1959).

Para estimar as concentrações de MT foi utilizada uma curva analítica plotada com GSH como padrão externo, pois embora este método mensure os tióis ácidos solúveis, a glutatona representa mais de 90 % dos grupos tióis reativos, podendo ser considerado um padrão adequado. De acordo com a descrição de KAGI (1991) os níveis de MT foram estimados assumindo a relação de 1 mol MT = 20 mol GSH.

3.5.3 - Extração e quantificação de GSH

A extração de GSH foi realizada seguindo o protocolo de BEUTLER (1975) com modificações por WILHELM-FILHO e TORRES (2005), no qual aproximadamente 50 mg de amostra de tecido foi homogeneizada em aproximados 500 µL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo sacarose 0,25 mol L⁻¹ em meio inerte (nitrogênio 99,9 %).

Logo a seguir as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g em centrífuga refrigerada modelo Mikro 220 R (Hettich, Alemanha) por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram então removidos e transferidos para microtubos estéreis previamente nomeados e tratados com DTNB 0,1 mol L⁻¹ em solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 a uma razão de 1:1.

As amostras foram incubadas no escuro durante 15 min e suas absorvâncias foram lidas em cubetas de quartzo em um espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer) a 412 nm. As concentrações de GSH foram estimadas usando uma curva analítica plotada com GSH como padrão externo.

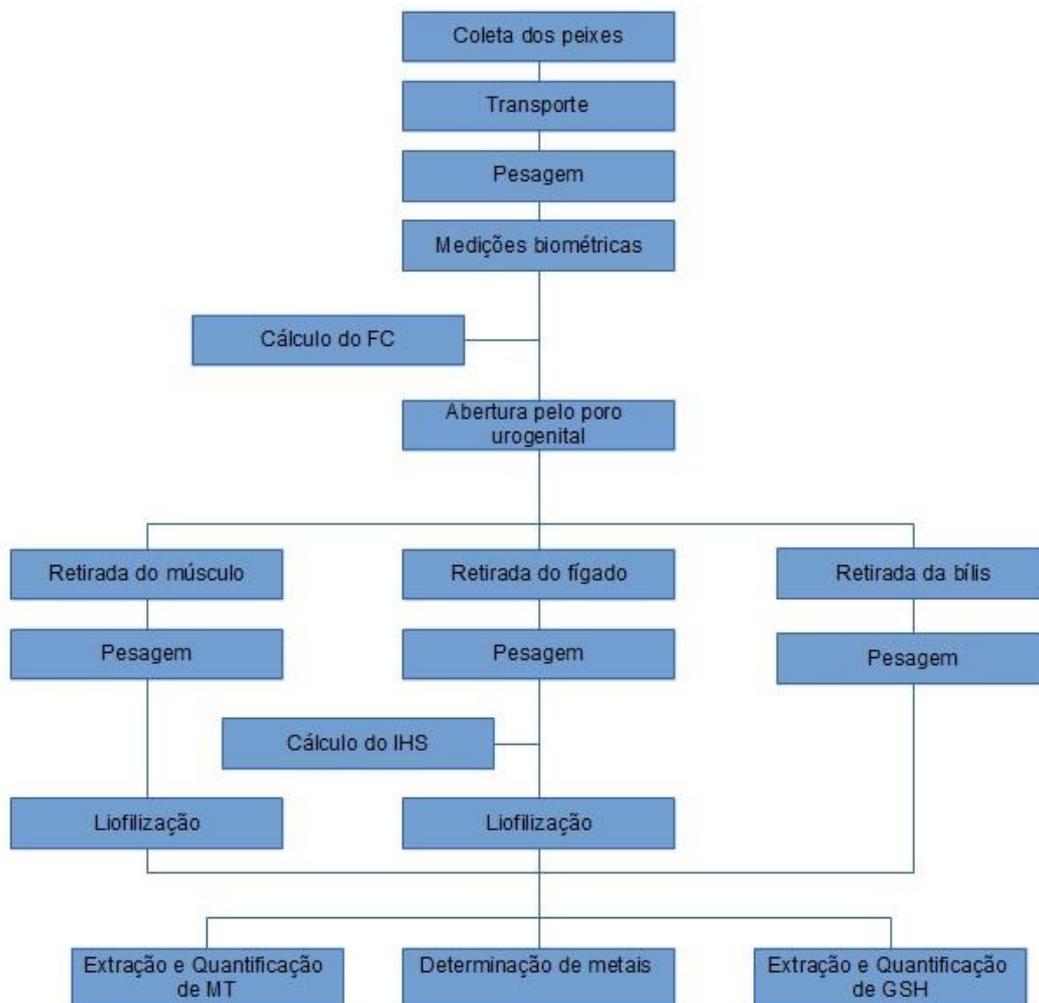


Figura 12 – Fluxograma das etapas experimentais do presente estudo.

3.6 – Análises estatísticas

O teste *W* de *Shapiro-Wilkes* foi utilizado na verificação da normalidade dos dados. Após verificação da não-normalidade dos dados, resolveu-se normalizá-los pela média do comprimento dos peixes de cada coleta, com a finalidade de inviabilizar possíveis influências devido a diferenças de tamanho e peso dos indivíduos. Após a normalização, testes paramétricos puderam então ser aplicados.

Para verificar a existência de correlação entre os parâmetros investigados nos diferentes órgãos levando em conta a sazonalidade foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson.

O teste ANOVA foi utilizado para verificar eventuais diferenças significativas entre os parâmetros nos diferentes órgãos levando também em conta a sazonalidade. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$ e as análises foram realizadas com auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft) e Microsoft Excel para Windows. Para as análises multivariadas, foi realizado o teste de Mann-Whitney para este fim.

Análises multivariadas também foram conduzidas, em parceria com a Dra. Isabella Bordon, da UNESP. Para investigação de dados relativos ao estresse oxidativo, realizou-se uma análise discriminante canônica. Os dados foram normalizados por *Z score* e todos os tecidos separados por estação foram analisados. Foram consideradas representativas funções com autovalor > 1 e variância individual $> 10\%$. Os grupos centróides foram plotados usando as funções discriminantes canônicas, e cada círculo indica as elipses de confiança de 95 %.

Para investigação dos dados de MT por tecido e estação, realizou-se uma análise de componentes principais para agrupamento por correlação e, posteriormente, por Cluster (distância euclidiana pelo método de Ward) para confirmação dos grupamentos por dissimilaridade. Neste caso, os dados também foram normalizados por *Z score*.

4 – Resultados e discussão

4.1 – Análises morfométricas

No verão, a maioria dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* apresentava-se em estágio sexual imaturo. No inverno, a maioria das fêmeas identificadas encontrava-se ovada.

Observa-se na Figura 13 que as médias de peso e comprimento dos indivíduos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), apresentando-se menores no verão (N=17) em relação ao inverno (N=20). Devido a essa diferença, todos os dados foram normalizados pela média do comprimento dos peixes de cada coleta, com a finalidade de inviabilizar possíveis influências quanto ao tamanho e peso dos indivíduos.

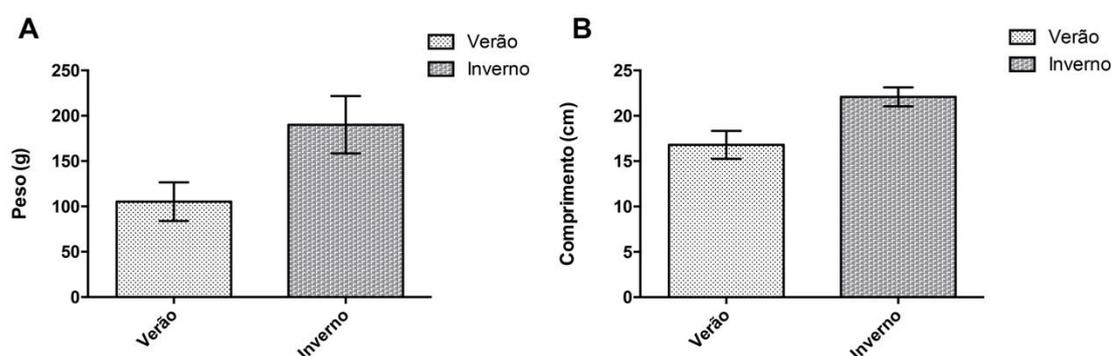


Figura 13 - Dados biométricos de (A) peso (g) e (B) comprimento (cm) dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* por estação de coleta (verão N=17, inverno N=20). Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Os Acarás, assim como as Tilápias, se reproduzem muito rapidamente durante todo o ano. De um modo geral os machos crescem mais rápido do que as fêmeas e até aproximadamente os cinco meses de vida ainda não atingiram idade de maturação sexual (JUNIOR *et al.*, 2011).

Este período de crescimento corrobora com os resultados obtidos no presente estudo quanto aos exemplares coletados na estação de verão se apresentarem ainda em estado sexual imaturo, não sendo viável sua identificação. De acordo com BARBIERI (1974) a maturação sexual de *G. brasiliensis* é atingida por volta 01 (um) ano nos machos e 1,5 ano nas fêmeas.

Trabalhos mais recentes indicam que *G. brasiliensis* atinge tamanho máximo de aproximadamente 25cm (Fonseca *et al.*, 2013), apresentando dimorfismo sexual entre os sexos e machos com tamanho maior que as fêmeas.

No presente estudo, as fêmeas ovadas na estação de inverno corroboram com esta afirmação, já que a média de tamanho é próxima ao de 25 cm citado como sendo o tamanho de adultos desta espécie.

4.2 – Metais

Os resultados de metais encontrados nas bílis dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados no presente estudo estão apresentados na Figura 14.

Observa-se que os metais Co, Ni, Cd, Hg e Pb apresentaram maiores concentrações na estação de verão; os metais V, Cr e Cu apresentaram concentrações semelhantes nas duas estações, enquanto que os metais Al e Fe predominaram na estação de inverno.

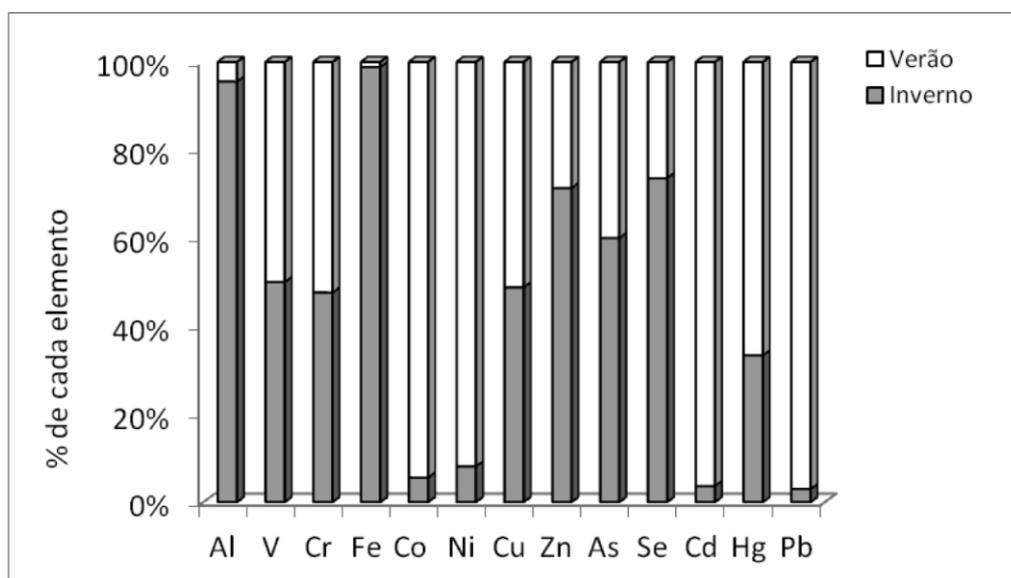


Figura 14 –Níveis de metais presentes nas bílis dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Lagoa Rodrigo de Freitas - RJ, 2014.

A maioria dos elementos determinados nos fígados dos espécimes coletados apresentaram concentrações mais elevadas na estação de inverno, com exceção dos metais Al, Cu, Hg e Pb (Figura 15). Foram observadas diferenças estatisticamente

significativas entre os metais: V, Cr, Co, Ni, Zn, As, Se, Hg e Pb, sendo o Ni o metal de concentração mais elevada no período de inverno e o Pb no período de verão.

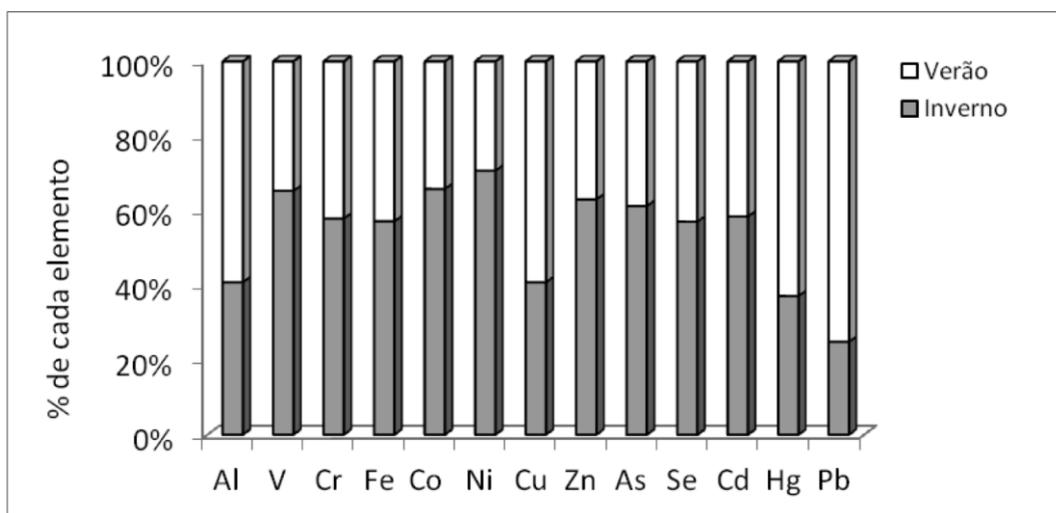


Figura 15 - Níveis de metais presentes nos fígados dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Lagoa Rodrigo de Freitas - RJ, 2014.

No músculo, a Figura 16 mostra que as maiores concentrações médias dos metais foram encontradas nos metais Al, V, Cr, Co, Ni, Cd, Hg e Pb, foram encontradas em espécimes coletados durante a estação de verão.

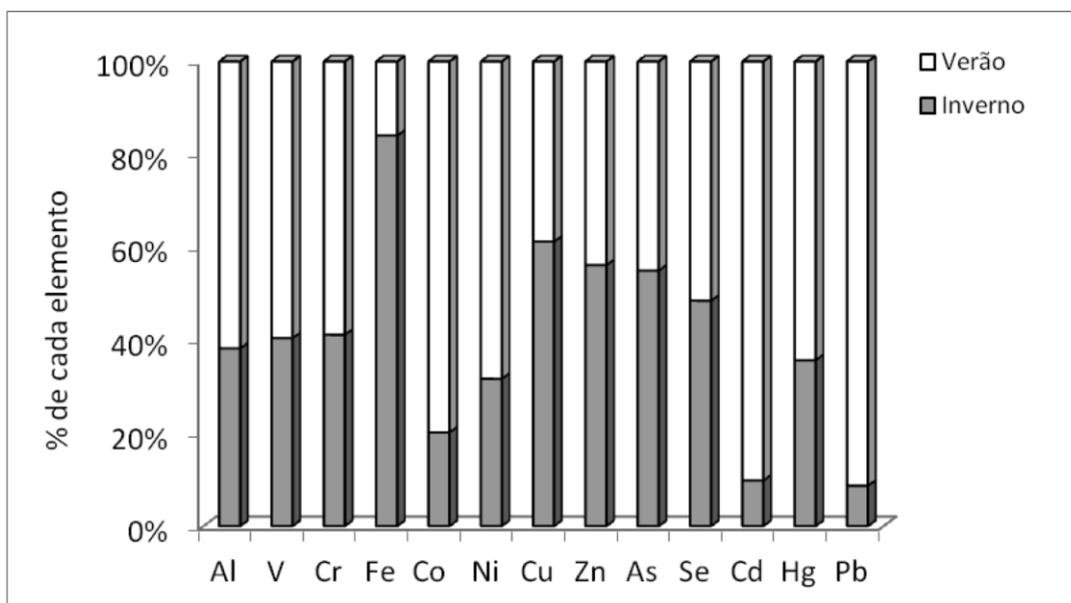


Figura 16 - Níveis de metais presentes nos músculos dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Lagoa Rodrigo de Freitas - RJ, 2014.

Para esta matriz, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre verão e inverno para os metais Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As e Hg. Sendo o Fe o metal de maior concentração no período de inverno e os metais Cd e Pb os metais de maiores concentrações no período de verão.

Os metais deixam rastros de degradação causando efeitos residuais no ambiente, pelo seu acúmulo gradual ou pelo contínuo estresse exercido pelo poluente. É importante salientar que uma pequena quantidade que permaneça no ambiente aquático pode causar efeitos subletais, como diminuição no crescimento e desenvolvimento das espécies, além de provocarem alterações na reprodução e no comportamento, comprometendo o ecossistema da área afetada (NRC, 2003).

Comparando as matrizes fígado e músculo, verifica-se que V, Cr, Co, Ni, Cd e Se foram maiores no inverno no fígado e no verão no músculo, enquanto o As, Hg, Pb e Al foram maiores no verão para ambos os tecidos. Cd e Se foram maiores no inverno no fígado e no verão no músculo. Ambos Fe e Zn foram maiores no inverno em ambos os tecidos, e Cu foram maiores no verão no fígado e no inverno no músculo.

Conforme a Figura 17, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), o mês de Setembro do ano de 2013 apresentou chuvas escassas, com precipitação mensal em torno de 50 mm, enquanto Março apresentou o segundo maior índice pluviométrico do ano de 2014, em torno de 80 mm.

Os índices pluviométricos podem ter íntima relação com os valores baixos encontrados no inverno e elevados encontrados no verão para alguns metais, embora diversos estudos cite motivos completamente opostos: No caso do verão, cita-se que, em decorrência do maior volume de água das chuvas e revolvimento dos sedimentos, ocorre a remobilização e disponibilização de contaminantes presentes destes sedimento para a coluna d'água, além de maior lixiviação, transferindo contaminantes em maiores quantidades para corpos d'água, acrescidos de concentrações de contaminantes na chuva em si.

Estes fatos resultariam em aumentos nos níveis de metais na área de estudo (CALMANO *et al.*, 1994; SAULNIER e MUCCI, 2000; KALNEJAIS *et al.*, 2007). No Brasil, as chuvas que ocorrem durante a época do verão são em geral muito intensas, com pingos grossos e pesados, o que poderia de fato causar este revolvimento e subsequente remobilização de contaminantes presentes no sedimento para a coluna d'água.

Por outro lado, outros estudos citam que o aumento de chuvas acarreta na diluição de contaminantes presentes na água, com consequente redução dos níveis destes nos organismos (Szefer *et al.*, 2004). Já no caso do inverno, estudos geralmente relacionam níveis mais altos de metais com o efeito de concentração dos elementos nos corpos d'água devido às escassas chuvas nesta época.

No presente estudo, os níveis de diversos metais variaram entre verão e inverno, não sendo possível obter uma relação direta dos níveis destes contaminantes nos músculos dos indivíduos de *G. brasiliensis*. Assim, futuros estudos devem também levar em consideração os níveis de metais na água do ambiente, que deve ser coletada ao mesmo tempo que os peixes, para possibilitar a inferência de relações deste tipo, entre os índices pluviométricos e os metais bioacumulados nos organismos.

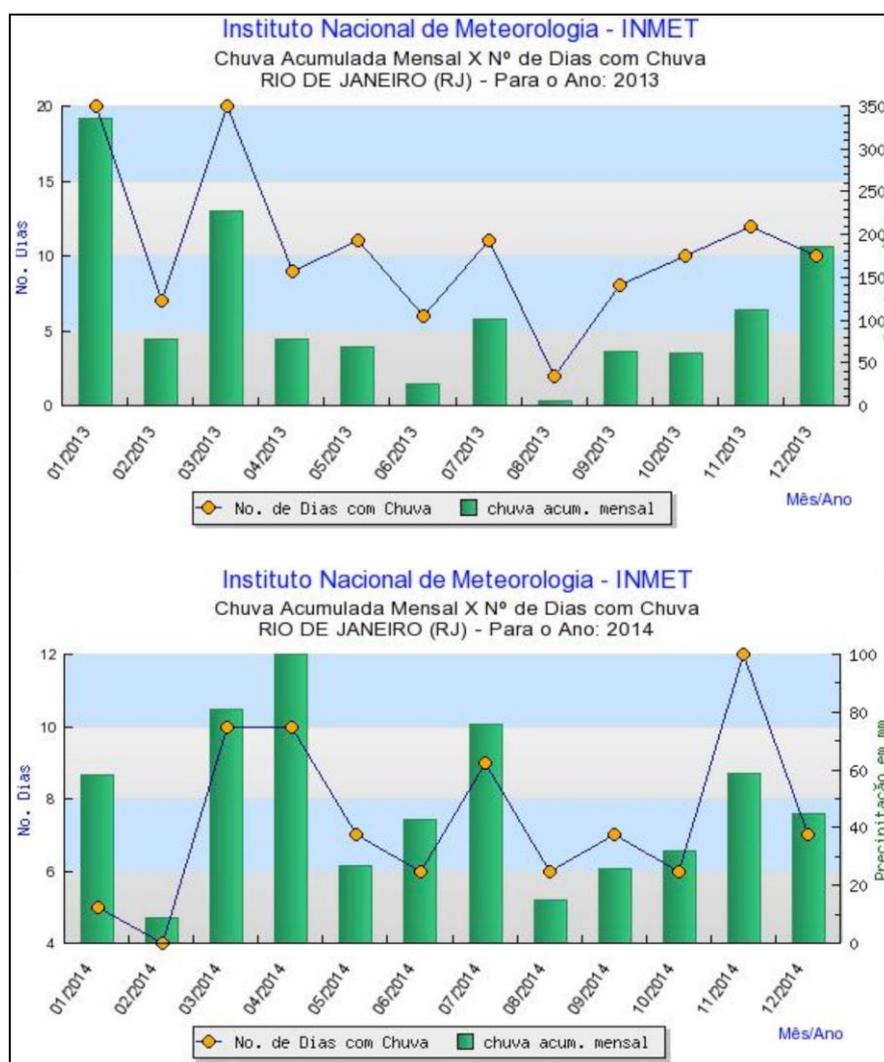


Figura 17 – Índices Pluviométricos para os anos de 2013 e 2014 para o estado do Rio de Janeiro (Fonte: INMET).

4.3 – Metalotioneína

Os resultados referentes à MT encontram-se apresentados na Figura 18.

Verificou-se que a distribuição de concentrações seguiu a ordem bÍlis => fÍgado => mÍsculo. Em ambas as estações, o mÍsculo foi a matriz que apresentou as maiores concentrações de MT.

Tal resultado pode estar relacionado à deficiência dos peixes em realizar a total destoxificação dos metais devido, possivelmente, aos altos nÍveis de contaminantes presentes no ambiente. Dessa forma, é provÁvel que os peixes estejam realizando uma rota de destoxificação nÃo-eficiente, ocasionando o acúmulo dos metais no mÍsculo. Esta possibilidade é de grande relevÃncia, tendo em vista que o mÍsculo é o tecido dos peixes de principal consumo humano.

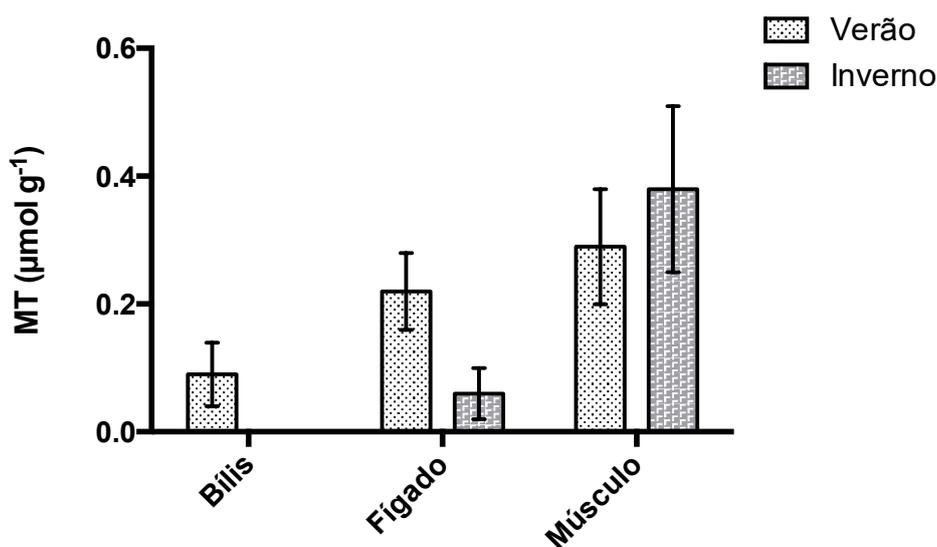


Figura 18 – Concentrações dos nÍveis de metalotioneína (MT) presentes no fÍgado, mÍsculo e na bÍlis dos espÍcimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos perÍodos de verÃo (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como mÉdia \pm desvio padrÃo.

No verÃo, foi verificada diferença significativa entre as concentraes de MT das bÍlis em relaçÃo ao fÍgado. Conforme esperado, os nÍveis de MT nas bÍlis foram inferiores aos nÍveis quantificados no fÍgado. Isto deve-se ao fato da bÍlis ser uma matriz de maior “rotatividade” no organismo do peixe, pois, ao se alimentar, o peixe introduz água em sua vesÍcula biliar, diluindo constantemente seu conteúdo enquanto que, no

fígado, ocorre efetivamente a metabolização dos xenobióticos, estando refletido neste órgão um maior tempo de exposição em relação à bÍlis.

Os resultados encontrados para fígado indicam o esperado: uma maior concentração neste órgão em relação às concentrações encontradas na bÍlis. Poucas são as referências acerca desta relação entre os níveis de MT presente nestas duas matrizes (bÍlis e fígado) porém, HAUSER-DAVIS (2014) em seu estudo analisou tilápias (*Oreochromis Niloticus*) expostas a concentrações sub-letais de cobre (2 mg L^{-1}) em ambiente de laboratório e em grupo controle apresentando concentrações de MT cerca de 250 vezes maiores no fígado em relação às concentrações encontradas na bÍlis.

Os resultados encontrados, tanto em HAUSER-DAVIS quanto no presente estudo reforçam a ideia de que o fígado, por ser um órgão metabolicamente ativo e efetivamente responsável pela destoxificação do organismo, acumula a MT com taxas de desintoxicação mais lenta do que a bÍlis. Reforça também a idéia de que a MT seja a via de desintoxicação mais eficiente devido à forma dinâmica em que ocorre a excreção.

Também foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de MT na bÍlis em relação à quantificação de MT encontrada no músculo. A presença de níveis elevados de no músculo MT, aliados à presença de diversos metais em quantidades maiores que no fígado e na bÍlis, indica não somente a falta de sucesso da destoxificação por meio das principais vias de destoxificação (bÍlis e fígado), como também o acúmulo destes contaminantes no principal órgão de consumo humano.

4.4 – Glutathiona reduzida

Os resultados referentes à GSH encontram-se apresentados na Figura 19.

Verificou-se que as concentrações em fígado foram maiores que no músculo em ambas as estações: verão e inverno; Não foi observada diferença estatisticamente significativa para este órgão, sendo esta diferença observada apenas nos músculos. Novamente, devido ao volume de amostra ser insuficiente, não foi possível quantificar a GSH na matriz bÍlis.

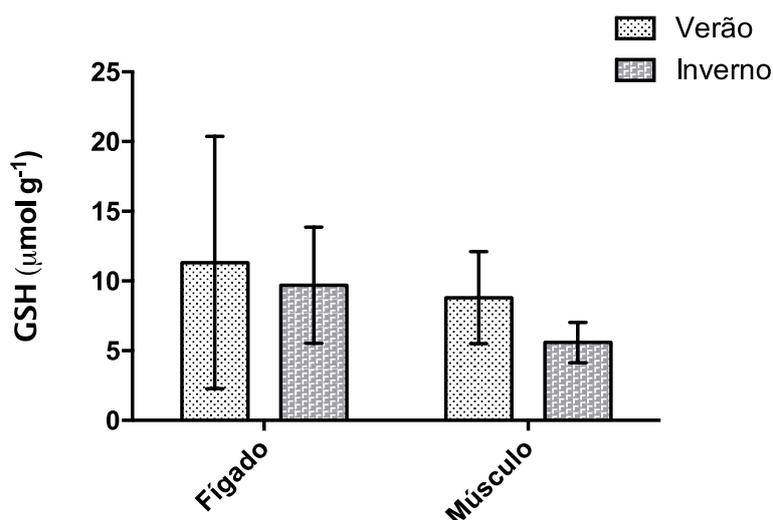


Figura 19 – Concentrações dos níveis de glutathiona (GSH) presentes no fígado e no músculo dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo. Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Estes resultados indicam efeitos mais altos contra o estresse oxidativo no fígado, como esperado, por este ser um órgão metabolicamente ativo. Diversos estudos indicam que esta proteína apresenta papel significativo no combate ao estresse oxidativo em peixes, como por exemplo o estudo por Viarengo *et al.* (1997) em seu estudo sobre os efeitos de metais (Cu^{2+} , Hg^+ e CH_3Hg^+) em fígados da espécie *Dicentrarchus Labrax*, sugerindo a eficácia da proteína GSH no combate ao estresse oxidativo.

No caso desse estudo, a GSH foi eficiente na restauração de atividade enzimática de certas enzimas do fígado, reforçando a visão de que este composto pode representar a primeira linha de defesa celular contra uma possível contaminação por metais aguda. No presente estudo, as correlações estatísticas encontradas, discutidas mais adiante, corroboram ainda que esta proteína é uma importante defesa contra a citotoxicidade de metais e ametais em *G. brasiliensis*.

4.5 – Caracterização do *status* alimentar através da análise das cores de bÍlis

Ainda são poucos os estudos relacionados à determinação de metais encontrados nesta espécie. SILVANO (2003) verificou concentrações de Cr, Mn, Ni, Zn e Fe em músculo e fígado de *Geophagus brasiliensis* (acará) da Lagoa Azul, em Siderópolis (SC). Estes metais, exceto o Fe, apresentaram maior concentração no fígado em ambas

as espécies, indicando que os peixes deste local apresentaram destoxificação eficiente de metais em geral.

Já no estudo realizado por FABRICIANO (2006), analisando *G. brasiliensis* de 4 locais de Piracicaba (MG), foram observados valores semelhantes aos do presente estudo para Cr, Zn, As e Hg em músculo. Infelizmente, o autor deste trabalho não apresentou os resultados como média \pm desvio padrão, apenas como média, com uma certa variância, ou então apenas pontos que não estão claros se são únicos ou médias, ou se estão apresentados com desvio padrão ou variância. Portanto não foi possível realizar comparações adequadas com outros locais com esta mesma espécie.

A eliminação do contaminante do organismo pode ocorrer por diversas formas, sendo a principal a biotransformação e excreção do corpo através de reações ocorridas no fígado. Quando não ocorre a destoxificação rápida e eficiente para determinado metal, este se acumula no músculo, órgão metabolicamente menos ativo. Dessa forma, como houve acúmulo de diversos metais no músculo dos indivíduos amostrados no presente estudo, a rota de destoxificação não está sendo eficiente. Os mecanismos bioquímicos e biomarcadores indicativos desta destoxificação estão discutidos na próxima seção.

As porcentagens e a quantidade de amostras de bÍlis classificadas estão dispostas na Tabela 2. Verifica-se que mais indivíduos em ambas as estações apresentaram bÍlis de cor verde escura, seguida de verde clara no verão e amarela no inverno (dois e um indivíduo, respectivamente).

Tabela 2 – Porcentagem e quantidade de amostras de bÍlis classificadas de acordo com a escala de cor determinada no presente estudo.

Cor	Verão	Inverno	Total
Verde Escura	88,23 % (15/17)	95% (19/20)	91,89 % (34/37)
Verde Clara	11,76 % (02/17)	-	5,4 % (2/37)
Amarela	-	5% (01/20)	2,7 % (1/37)

A análise da coloração das bÍlis seguiu o padrão exemplificado na Figura 20.

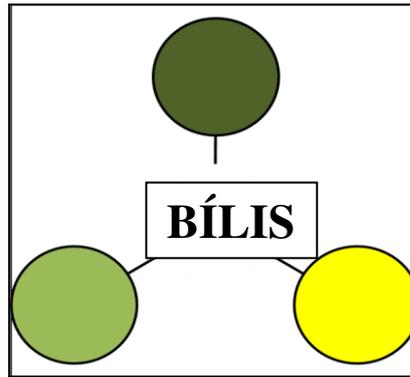


Figura 20 – Esquema de coloração das bílis de *Geophagus brasiliensis* coletadas nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) do presente estudo.

Diversos autores vêm utilizando a coloração das bílis de peixes como um importante fator de análise correlacionando o status alimentar dos espécimes com as concentrações de xenobióticos presentes neste fluido (KUBITZA, 1999). No presente trabalho, a maior parte das amostras de bílis coletadas e quantificadas foi englobada no mesmo grupamento de cor (verde escura), apresentando *status* alimentar semelhante. Ainda segundo KUBITZA (1999) e conforme destacado na Figura 20, quando o peixe está em seu estado saudável, a vesícula biliar apresenta-se pequena e com líquido de cor amarelada; Nos peixes que não se alimentaram recentemente, a vesícula biliar fica cheia e geralmente de cor verde escura, e a bílis apresenta-se mais concentrada e com maiores concentrações de xenobióticos.

Um fator adicional à relação de coloração e tempo de jejum é a diluição sofrida à medida que o peixe se alimenta, uma vez que a entrada de água durante o processo de alimentação e a consequente diluição da bílis só será possível em indivíduos que estejam se alimentando regularmente. Dessa forma, a diluição durante o ato da alimentação é um fator que merece deve ser levado em consideração ao relacionar a coloração do líquido da vesícula biliar com concentrações de xenobióticos.

Conforme a Tabela 3, três indivíduos apresentaram status alimentares diferentes da maioria. O indivíduo Acará 02, coletado durante a campanha de inverno apresentou coloração biliar amarela, e os indivíduos Acará 03 e 05, coletados durante a campanha de verão, apresentaram coloração verde clara.

Dentre os resultados para metais e MT obtidos para os indivíduos com coloração Amarela (02-Inv) e Verde clara (05-Ver), dados interessantes foram observados. As concentrações dos metais Al, V, Cr, Fe, Ni, Zn, Hg e Pb apresentaram-se acima dos valores médios, às vezes estando acima das concentrações encontradas nos indivíduos

de coloração verde escura, cujas concentrações esperadas, de acordo com a bibliografia, seriam mais elevadas.

A questão a ser respondida é se este resultado pode estar indicando um ambiente altamente impactado onde, mesmo peixes com fluido biliar recente, estão acumulando altas concentrações de xenobióticos. Tal observação deve ser levada em consideração em futuros estudos. No presente estudo, porém, estes dados foram incluídos em todas as análises estatísticas por estarem em número muito baixo, insuficiente para análise estatística diferenciada.

Tabela 3 – Tabela indicativa dos indivíduos com concentrações acima dos níveis médios para metais e MT dos espécimes de *G. brasiliensis* com bílis mais diluída, de acordo com a escala de cor determinada no presente estudo.

	Amarela (2-Inv)	Verde clara (3-Ver)	Verde clara (5-Ver)
Al	↑	-	↑
V	-	-	↑
Cr	↑	-	↑
Fe	↑	-	-
Co	-	-	-
Ni	↑	-	-
Cu	-	-	-
Zn	↑	-	↑
As	-	-	-
Se	-	-	-
Cd	-	-	-
Hg	-	-	↑
Pb	↑	-	-
MT	-	-	-

4.6 – Fator de Condição e Índice Hepatosomático

A Figura 21 demonstra os valores do FC e do IHS.

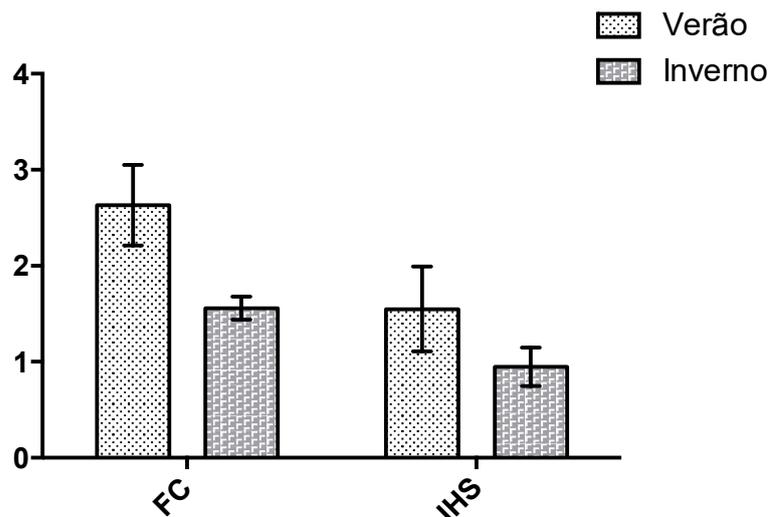


Figura 21 – FC e IHS dos espécimes de *Geophagus brasiliensis* coletados nos períodos de verão (N=17) e inverno (N=20) deste estudo. Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Conforme demonstrado na figura, os valores do FC e do IHS se apresentaram significativamente diferentes ($p < 0,05$), sendo superiores no verão em relação aos valores encontrados no período do inverno. A diferença entre os valores de FC foi maior do que a diferença observada para o IHS.

Diversos estudos relatam um fator de condição mais baixo onde existe contaminação por metais (LAFLAMME *et al.*, 2000; EASTWOOD e COUTURE 2002; Rajotte *et al.* 2003) enquanto outros reportam que um aumento no fator de condição é, às vezes, indicativo de efeitos tóxicos (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006).

Existem porém, muitas divergências a respeito da relação entre o FC e efeitos de poluentes. Dethloff e colaboradores (2001) não encontraram em seu estudo diferenças significativas entre o FC e a contaminação por Cu em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), assim como no estudo apresentado por Lohner e colaboradores (2001) em *Lepomis sp.*, onde, apesar das grandes diferenças nos níveis de Cd, Cr e Se em fígado e dos níveis de Se superiores aos níveis de limite de toxicidade em efluentes contendo cinzas de carvão nos Estados Unidos, a relação com o FC não apresentou-se de forma significativa, indicando que os níveis ambientais e os padrões de qualidade do meio ambiente não seriam suficientes como uma ferramenta para a proteção da vida aquática (Bervoets e Blust, 2003).

Em contrapartida HAUSER-DAVIS (2012) encontrou distinção entre o FC de peixes de em áreas impactadas e não impactadas; Os peixes dos locais impactados por metais apresentaram FC inferior aos peixes de locais menos contaminados, portanto

menos impactados, apresentaram valores reduzidos. O estudo indica que a população com os valores de FC inferiores estão em pior condição. Isto é consistente com outros estudos que relacionam os níveis de metais no ambiente e tecidos de peixes com o FC (CLEMENTS e REES, 1997; LAFLAMME *et al.*, 2000; EASTWOOD e COUTURE, 2002).

Com relação ao IHS, BARBER *et al* (2007) em seu experimento com peixes expostos a substâncias tóxicas, observou significativo aumento dos valores de IHS refletindo o stress químico sofrido pelo peixe exposto a este tipo de substância.

Vários estudos evidenciam que este parâmetro pode ser um útil como indicador de contaminação ambiental por meio de aumentos significativos nos seus valores e devido à modificações metabólicas induzidas por exposição crônica a metais, inclusive com relatos de fígados de tamanho aumentado e repetida presença de nódulos e tumores em locais contaminados por estes contaminantes (NORRIS *et al.*, 2000).

Em contrapartida, menores valores de IHS em regiões com altas concentrações de toxinas também já foram relacionados com a saúde hepática dos peixes (CALADO, 2015). Desta forma, fica claro que a literatura apresenta relatos discrepantes, pois ainda há outros estudos que evidenciam que os valores de IHS de peixes expostos a metais não são diferentes de valores de grupos não-expostos (MARTIN e BLACK, 1996; EASTWOOD e COUTURE, 2002).

No presente estudo, o local de estudo foi apenas um, portanto não há como realizar comparações com locais diferentes com esta mesma espécie com relação à presença de graus diferenciados de metais no ambiente, pois inclusive são poucos os estudos conduzidos com *G. brasiliensis*. Porém, as diversas correlações estatísticas observadas do FC e do IHS com os metais indicam relações diretas e efeitos dos metais nestes parâmetros, discutidos na próxima seção, corroborando com diversos estudos que indicam efeitos de metais em parâmetros morfométricos de diferentes espécies de peixes.

Outras divergências, neste caso, com relação ao metabolismo dos indivíduos, não referentes à presença de contaminantes, são encontradas em estudos com outras espécies, em relação ao FC e IHS.

QUEROL e colaboradores (2002), por exemplo, constataram uma variação do FC associada ao período de reprodução assim como DAGA e colaboradores (2010) consideram que fatores abióticos como o aumento da temperatura da água, da condutividade elétrica e instabilidades hidrológicas exercem influência na atividade

reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* podendo afetar adversamente a reprodução dos peixes.

No estudo de BARBIERI (1989) os peixes apresentaram melhores condições alimentares no período que antecede a reprodução, sem contudo, diminuir atividade neste período e os valores de IHS diminuem logo após o período de reprodução o que pode indicar uma possível relação de acúmulo de reservas energéticas para este período além do FC ser considerado um bom indicador de período de desova.

Já resultados obtidos para *L. platymetopon*, em Uruguaiana (QUEROL *et al.*, 2002), onde os resultados indicam que o IHS pode estar relacionado com o acúmulo de reservas energéticas para o período de inverno são semelhantes aos encontrados por AGOSTINHO *et al.* (1990), que também sugere a mobilização das reservas energéticas para a reprodução.

No presente estudo a reprodução não está bem delimitada porém, os espécimes coletados na campanha durante o verão encontravam-se jovens e seus índices FC de IHS elevados em relação ao inverno, o que pode estar relacionado com a possível mobilização energética para o futuro momento de reprodução.

4.7- Correlações estatísticas e comparações entre matrizes analisadas

4.7.1 - Correlações estatísticas nas matrizes analisadas

De acordo com Bryman e Cramer (2011), correlações estatísticas são muito fracas quando $0,00 < r < 0,19$; fracas quando $0,20 < r < 0,39$; moderadas quando $0,40 < r < 0,69$; fortes quando $0,70 < r < 0,89$; e muito fortes quando $0,90 < r < 1,00$.

No presente estudo, foram encontradas inúmeras correlações estatisticamente significativas (positivas e negativas) entre as proteínas, metais e índices (Tabelas 4 a 8). O valor “r” entre parênteses refere-se ao coeficiente de correlação encontrado entre as variáveis.

Tabela 4 – Correlações encontradas em fígados dos espécimes de *G. brasiliensis* na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.

MT x Al	MT x Ni	MT x Zn	MT x As
0,42	-0,62	-0,42	-0,41
IHS x Al	IHS x V	IHS x Cr	IHS x Cd
-0,42	0,45	-0,41	-0,51
FC x Cu	FC x Cd	FC x Pb	
-0,54	-0,42	-0,72	
FC x MT	FC x IHS		
-0,51	0,41		

Tabela 5 – Correlações encontradas em fígados dos espécimes de *G. brasiliensis* na estação de inverno e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.

GSH x Pb	GSH x MT	GSH x IHS	GSH x FC
0,52	-0,41	0,60	0,50
FC x Al	FC x Cu	FC x Cd	FC x Pb
0,48	0,42	0,43	0,51
IHS x Fe			
-0,66			

No fígado, nos peixes coletados durante o verão, foram encontradas correlações moderadas e uma única correlação forte entre o FC e o metal Pb.

Tabela 6 – Correlações encontradas em músculos dos espécimes de *G. brasiliensis* na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.

GSH x Zn	GSH X As
0,56	0,56
IHS x Hg	IHS x FC
0,55	0,41
FC x Se	FC x GSH
0,62	0,64
MTx Zn	
0,41	

Tabela 7 – Correlações encontradas em músculos dos espécimes de *G. brasiliensis* na estação de inverno e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.

IHS x Ni
-0,52
FC x Zn
0,41
MT x As
0,44

Foram encontradas menos correlações nos músculos em relação ao fígado em ambas estações. Para a bÍlis foi possível quantificar MT apenas nas amostras coletadas durante o verão. As correlações descritas na Tabela 8 referem-se a estes resultados.

Tabela 8 – Correlações encontradas na bÍlis dos espécimes de *G. brasiliensis* na estação de verão e seus respectivos valores de “r” no presente estudo.

IHS x Cr	IHS x V	IHS x Fe	IHS x Cu	IHX x Zn	IHS x As	IHS x Cd
-0,69	0,65	-0,59	-0,43	-0,49	-0,54	-0,42
FC x IHS	FC x Ni					
0,41	0,46					
MT x Cr	MT x Pb					
0,4	0,61					

As diversas correlações encontradas entre os metais e os parâmetros morfométricos reforçam a afirmativa de que o FC e o IHS são importantes parâmetros de análise quanto à contaminação por metais, pois aparentam ser diretamente afetados por estes contaminantes. Assim, tais correlações podem indicar que estes contaminantes estariam exercendo influência direta sobre este parâmetro morfométrico podendo comprometer o desenvolvimento saudável dos espécimes.

No entanto, a correlação positiva entre o FC e as MT presentes no fígado e na bÍlis dos peixes indicam que, apesar da presença dos metais, as MT estariam desempenhando seu importante papel de proteína detoxificadora.

Um fator importante a ser levado em consideração em estudos de monitoramento ambiental é o período reprodutivo da espécie em questão. Alguns estudos na literatura

reportam que *G. brasiliensis* pode reproduzir-se durante o ano todo (VONO, 1995), enquanto outros indicam um pico reprodutivo na primavera (MONTEIRO *et al.*, 2010). Isto deve ser analisado previamente, já que existem relatos de que esforços reprodutivos podem levar a atividade metabólica aumentada, produção de ERO e, conseqüentemente, estresse oxidativo (PETES *et al.*, 2008) como resultado de energia reduzida disponível para defesas antioxidantes (LIÑÁN-CABELLO *et al.*, 2004; LAVRADAS *et al.*, 2016).

No presente estudo, a maioria das fêmeas identificadas encontrava-se ovada no período de inverno, onde foi verificado tanto um valor IHS quanto de GSH mais baixos. As correlações observadas entre o IHS, o FC e a GSH indicam que estes parâmetros estão intrinsicamente ligados, e devem, portanto, ser analisados mais a fundo levando em conta esforços reprodutivos em futuros estudos.

Além disso, as correlações observadas entre MT, GSH e os metais determinados no presente estudo indicam relações importantes entre estes parâmetros, tanto na destoxificação destes contaminantes do corpo, quanto na casualidade entre estresse oxidativo e metais.

As correlações da MT com os metais indicam que esta metaloproteína é realmente um bom biomarcador de exposição a estes contaminantes, importante tanto na destoxificação de metais não-essenciais quanto na homeostase de metais essenciais.

Além disso, embora esta metaloproteína tenha sido reportada como apresentando também atividade de captura de radicais livres, ou seja, anti-oxidante, este mecanismo de proteção é postulado como sendo secundário (DONDERO *et al.*, 2005), ocorreu apenas uma instância de correlação desta metaloproteína com a GSH (fígado, estação de inverno), biomarcadora de estresse oxidativo, corroborando o fato de que a MT está de fato relacionada com o mecanismo de destoxificação de metais, e não com atividade anti-oxidante.

Já as diversas correlações da GSH com os diferentes metais determinados indicam que estes contaminantes afetam diretamente este biomarcador de estresse oxidativo.

4.7.2 – Comparações entre as matrizes fígado e bÍlis

Com relação especificamente à comparação entre as matrizes fígado e bÍlis, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para MT, V, Cr, Fe, Co, Ni,

Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg e Pb. Destas variáveis, todos apresentaram-se mais baixos em bÍlis, com a exceção de Cd, que foi mais alta nesta matriz em comparação com o fÍgado, indicando destoxificação rÁpida desde metal pela bÍlis.

Para comparar as duas matrizes, foi realizada uma anÁlise de componentes principais (PCA, do inglÊs *Principal Component Analysis*), seguida de uma anÁlise de *Cluster* através do mÉtodo de distÂncia euclidiana por mÉtodo de Ward para confirmação dos grupamentos por dissimilaridade.

A PCA extraiu trÊs componentes principais, respondendo por mais de 80% da variabilidade dos dados. Verificou-se que a componente 01, com maior representatividade, foi a principal responsÁvel pela separação dos dados por tipo (fÍgado x bÍlis), sendo que fatores MT, V, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Hg e Hg tiveram alta correlação com essa componente, influenciando a separação dos dados de fÍgado. Comparando esses dados com os dados brutos de concentração de cada um desses parÂmetros, observa-se que hÁ realmente uma maior concentração desses metais e MT no fÍgado, corroborando com este resultado.

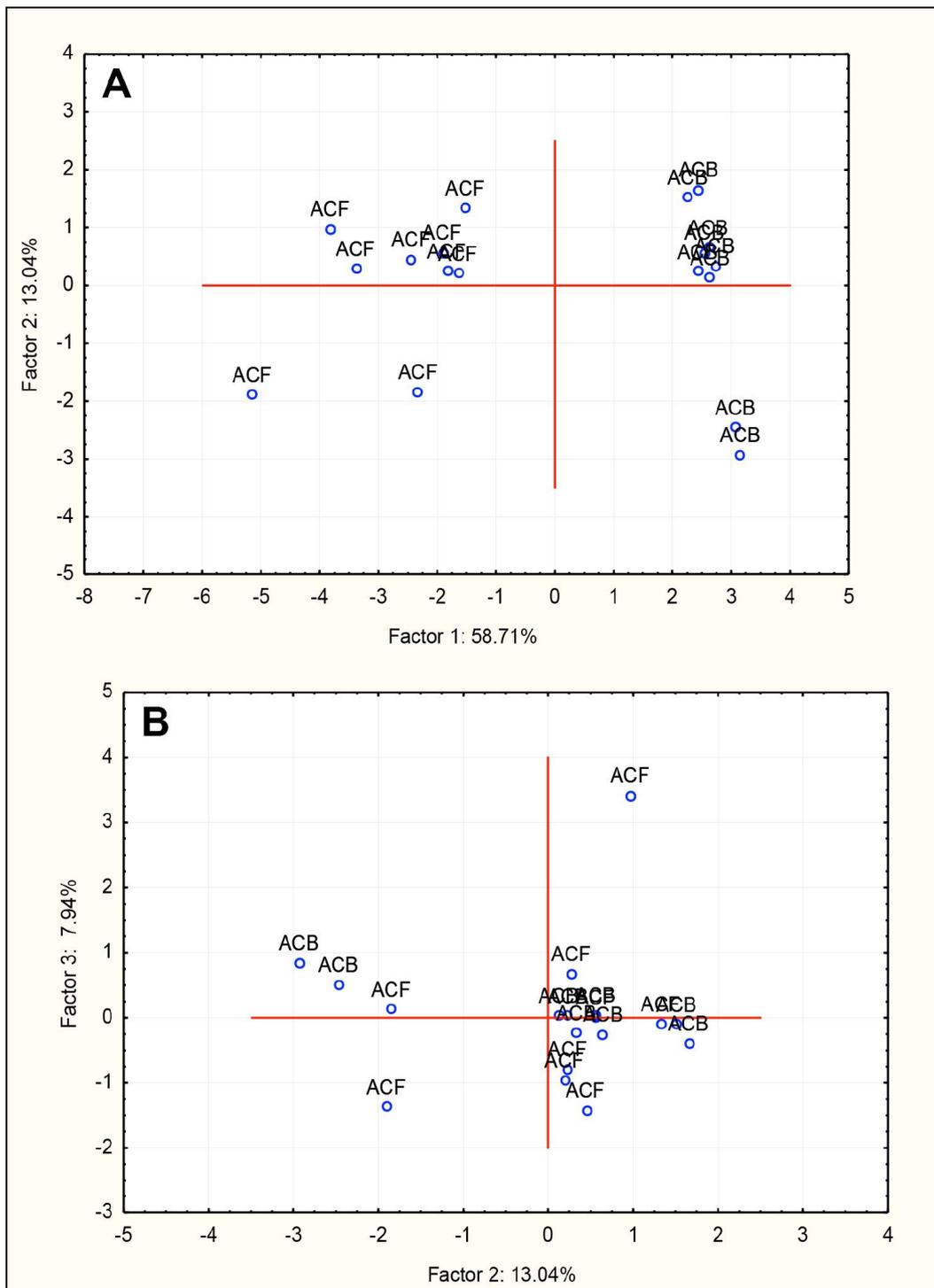


Figura 22 - Separação dos componentes principais: Fator 1 x Fator 2 (A) e Fator 2 x Fator 3 (B) na comparação de concentrações de metais e MT em *G. brasiliensis*.

A Análise de *Cluster* mostrou 100% de dissimilaridade entre dois grupos principais (fígado e bÍlis), separados pelos mesmos compostos observados nos resultados de PCA, confirmando que fÍgado e bÍlis são agrupamentos reais.

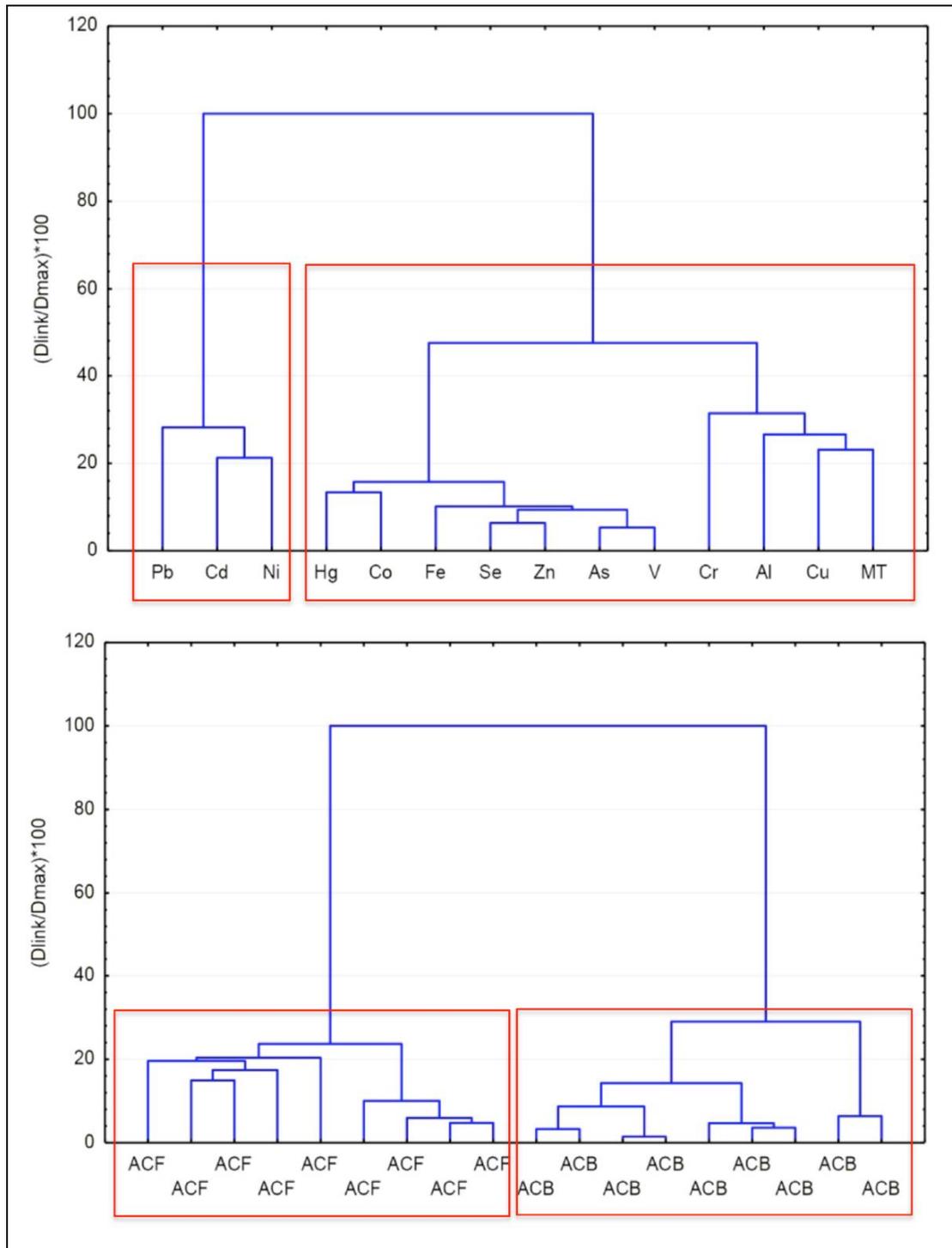


Figura 23 - Dendrograma de separação dos dados de bÍlis e fÍgado de *G. brasiliensis* pelo método de distância euclidiana de Ward para confirmação dos grupamentos por dissimilaridade.

Cr, Fe, Co, Cu, and Zn não foram eficientemente removidos pela via biliar, já que se apresentaram em concentrações mais altas no fÍgado. Cd, porém, apresentou-se significativamente mais alto na bÍlis, indicando excreção rápida deste elemento.

O PCA e a Análise de Cluster mostraram correlações altas de MT com V, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Hg e Pb, tanto no fígado quanto na biliar. Portanto, a indução de MT na excreção biliar pode ser usada como alternativa para indicar exposição a metais em *G. brasiliensis*, o que é interessante pois esta matriz é menos complexa que fígado e pode ser amostrada de forma não-letal, por canulação hepática (GROSELL *et al.*, 1997).

Para verificar qual matriz é mais interessante para estudos de sazonalidade, foi realizada uma análise discriminante canônica. Esta obteve 02 funções canônicas (FC) mais representativas, contribuindo com 97,6% da distribuição de dados, a primeira contribuindo com 78,6% da variabilidade dos dados, e a segunda contribuindo com 19% da variabilidade dos dados.

A função 01 (um) teve contribuição de Zn (coeficiente da variável (CV) = -1.59) e Fe (CV= -0.79), efetivamente separando os dados de fígado inverno dos músculos em ambas a estações.

Já função 02 teve contribuição dos coeficientes de Zn, Cu, Se (respectivamente, CV= -1.48; 0.90; 1.70) na separação de músculos de inverno dos dados de fígado de verão. Os dados desta análise estão dispostos na figura 24.

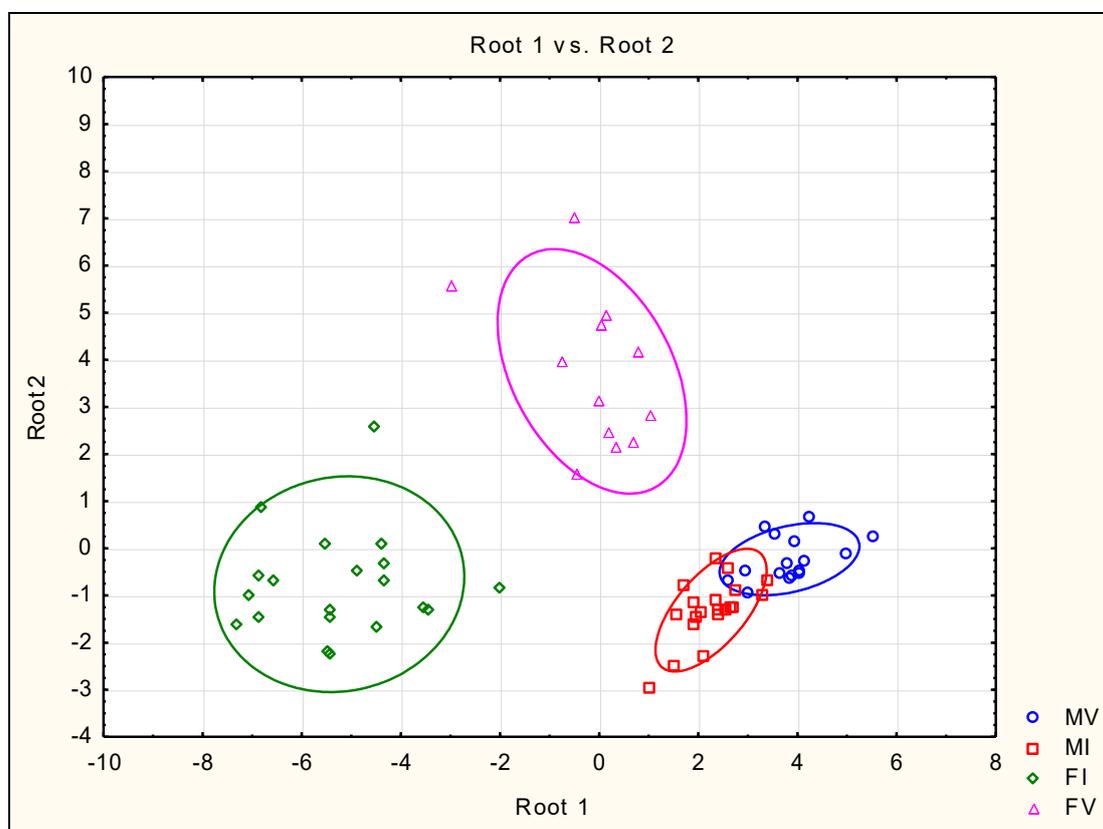


Figura 24. Gráficos de dispersão das funções discriminantes de músculo e fígado de *G. brasiliensis* por estação. MV – Músculo verão; MI – Músculo inverno; FI – Fígado inverno; FV – Fígado verão.

Embora tenha se observado separação de todos os tecidos por estação, a sobreposição dos dados de músculos permite inferir que a análise de fígados na espécie *G. brasiliensis* é mais adequada para averiguar diferenças na bioacumulação de metais em função da estação do ano. Infelizmente, não foi possível a análise de bÍlis em ambas as estações, para verificar se esta matriz é mais adequada que fígado neste contexto.

4.8 - Consumo humano

Os hábitos alimentares estão entre as principais preocupações do ser humano, principalmente em relação à ingestão de nutrientes. O peixe se destaca entre os alimentos de fundamental importância, sua ingestão como fonte de proteína é alta e sua contribuição mundial varia de 10 a 15% do total para consumo humano no mundo (CARVALHO, 2005; WILSON e CORRÁZE, 2007).

A fim de proteger a saúde humana e com a necessidade de se realizar o controle sobre os níveis admissíveis de contaminantes em alimentos, diversos órgãos, em diversos países estabeleceram limites padrões.

No Brasil, o decreto nº 55.871 de 26 de Março de 1965 do Ministério da Saúde (MS), estabeleceu normas reguladoras para aditivos em alimentos, dentre os quais estava estabelecido o limite máximo permissível ou limite máximo de tolerância (LMT) para elementos como As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Se, Zn e Pb, porém, neste decreto os valores de LMT são relativos ao consumo de qualquer alimento (BRAZIL, 1965).

Os LMT especificamente relacionados ao consumo de pescado foram estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 27 de agosto de 1998, por meio da portaria nº685. Entretanto, a ANVISA se deteve somente aos principais contaminantes inorgânicos, deixando algumas lacunas sobre os demais poluentes (SANTOS, 2011). Dessa forma, assim como as legislações internacionais, não foi possível estipular os LMT para todos os elementos determinados no presente estudo.

A Tabela 9 abaixo destaca os metais que obtiveram valores dos LMT relacionados ao consumo de pescado acima dos níveis estabelecidos pelas legislações brasileiras (ANVISA) e internacionais (Comunidade Europeia – CE - FDA, FAO/WHO e EPA) (FAO, 1983; USFDA, 1993; EC, 2001).

Tabela 9 – Limites Máximos de Tolerância (LMT) (dados como valor máximo ou valores mínimos e máximos) relacionados ao consumo de pescado comparados com o presente estudo (músculo de *G. brasiliensis*). Os valores estão apresentados como mg kg⁻¹ p.s. Valores em negrito indicam valores acima dos LMT estipulados.

Metal	FAO/WHO	EPA	FDA	CE	ANVISA	Presente estudo
Al	-	-	-	-	-	15,9 – 18,6
V	-	-	-	-	-	0,1 – 0,3
Cr	12,0	0,1 - 0,9	3,9	-	0,1	1,5 – 3,3
Fe	-	-	-	-	-	121,6 – 421,9
Co	-	-	-	-	-	0,01 – 0,05
Ni	-	-	24	-	5,0 *	0,3 – 0,7
Cu	30,0	1,0 - 20,0	-	-	30,0	1,1 – 2,0
Zn	50,0	10,0 - 30,0	-	-	50,0	50,9 – 69,8
As	-	-	-	-	1,0	2,2 – 3,2
Se	-	-	-	-	0,3	4,3 – 5,7
Cd	1,0	> 2,0	1,11	0,015	1,0	0,02 – 0,7
Pb	2,0	0,1 - 0,8	0,51	0,6	2,0	0,07 – 1,85
Hg	-	-	-	0,15	0,5 – 1,0 **	0,08 – 1,0

* Para qualquer alimento

** Valores para não predadores e predadores, respectivamente.

Conforme a Tabela 5, os metais em negrito (Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb e Hg) encontram-se com níveis acima dos permitidos pelos órgãos de fiscalização nacionais e/ou internacionais. Dentre estes metais destacados, Cr, As e Se obtiveram 100% dos indivíduos quantificados (37 amostras; N=17 no verão; N=20 no inverno) acima dos níveis permissíveis enquanto para o metal Zn foram encontrados 10 exemplares acima dos níveis permitidos na estação de inverno e 01 (um) exemplar na estação verão.

Para o metal Cu, que indica poluição por esgoto doméstico, 100% dos indivíduos da estação de inverno estiveram acima e 07 indivíduos na estação verão, o metal Pb obteve indivíduos acima apenas na estação de verão (N=13) enquanto que para o Cd, 09 indivíduos estiveram acima no total sendo 01 no inverno e 08 no verão.

O metal Hg não obteve nenhum indivíduo acima dos níveis. Embora os metais destacados não estejam compreendidos no grupo dos metais tóxicos, até mesmo os elementos essenciais mostram-se tóxicos acima de certos limites, e o consumo de peixes com concentrações de metais acima do LMT não é indicado, podendo causar sérios riscos aos consumidores humanos.

Considerando a dose ingerida diária de um elemento específico, é possível estimar a quantidade máxima segura de alimento que pode ser consumido sem risco de efeitos patológicos. Este método gera uma dose de referência chamada de PTDI (do

inglês, *Provisonal Tolerable Daily Intake*), ou seja, o nível de exposição máximo diário a um contaminante, no caso, metais, estabelecidos pelo comitê conjunto da FAO e da OMS a respeito de Aditivos em Alimentos (FAO/WHO, 2011).

De acordo com a literatura, o Brasil tem um consumo médio diário de 24,74 g de peixe per capita, ou uma média de 173,18 g por semana. No entanto, na área metropolitana do Rio de Janeiro, há um maior consumo de pescado fazendo com que este valor chegue a 355,00 g por semana, ou o equivalente a 50,71 g dia⁻¹. Assim, para calcular o PTDI, utilizou-se o valor mais elevado do metal encontrado em músculos de *G. brasiliensis* de cada estação multiplicado pelo consumo médio de peixe na área metropolitana do Rio de Janeiro e dividido pelo peso corporal médio de um adulto brasileiro, estimado em 70 kg (BRASIL, 2009), como mostrado na equação abaixo:

$$\frac{\text{Concentração mais alta de cada elemento por estação (mg kg}^{-1}\text{)}}{70 \text{ kg}} \times 50,71 \text{ g dia}^{-1}$$

Estes valores calculados foram então comparados aos valores estipulados pela FAO e OMS, conforme verificado na tabela 6 abaixo. Os dados estão apresentados como µg kg⁻¹ dia⁻¹. Cabe ressaltar que alguns metais não possuem limite estabelecido de consumo, como V, Co, e Se, e que o PTDI de Pb foi recentemente retratado.

Tabela 10 – Valores de referência do nível de exposição máximo diário a metais propostos pela WHO e os valores estimados de ingestão diária no presente estudo para verão e inverno usando as médias obtidas para cada elemento em músculo de *G. brasiliensis*.

Metal	WHO	Presente estudo – Inverno	Presente estudo – Verão
Al	142,85	11517,39	13500,57
V	-	120,98	231,82
Cr	-	1101,13	2397,86
Fe	800	305701,61	88090,51
Co	-	7,24	36,22
Ni	5	217,33	514,34
Cu	500	1456,1	847,58
Zn	1000	50608,58	36895,15
As	7-Feb	2347,15	1644,45
Se	-	4158,22	3115,04
Cd	1	14,49	543,32
Hg	0,57	57,95	72,44
Pb	-	50,71	1340,19

Os resultados indicam que os valores do presente estudo, tanto para o verão quanto para o inverno, são significativamente mais altos do que os valores permitidos pela legislação internacional, em alguns casos até mesmo mais de 10.000 vezes maiores.

Também é importante notar que a legislação não costuma levar em consideração a especiação do elemento, por exemplo, ou Arsênio total, orgânico ou inorgânico, o que pode levar a conclusões errôneas, pois a toxicidade dos metais, muitas vezes, depende também da espécie encontrada (HUNG *et al.*, 2004).

Cabe ressaltar também que, para metilmercúrio, o limite de consumo é de 0,23 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Infelizmente, porém, não foram realizadas análises de especiação de Hg neste estudo. Todavia, os níveis de Hg total observados foram mais de 10 vezes maiores que os permitidos, levando a crer que, provavelmente, os níveis de metil mercúrio também estariam acima do permitido.

Isto indica que a Lagoa Rodrigo de Freitas apresenta-se extremamente contaminada por estes metais, e que os peixes também apresentam-se altamente contaminados, com bioacumulação significativa destes elementos.

Na Lagoa Rodrigo de Freitas, a população pertencente à colônia dos pescadores se alimenta de peixes pescados na área diariamente, além de venderem estes peixes para o consumo humano para a população em geral. Portanto, o risco a consumidores humanos é real, extremamente alto, e não deve ser ignorado

5 – Conclusões

- A bÍlis aparentemente constitui uma via mais rÁpida e eficiente de destoxificação de Cd em *G. brasiliensis*;
- A MT mostrou-se um bom biomarcador de exposição a metais, estando relacionada apenas com a destoxificação de metais não-essenciais e homeostase de metais essenciais, e não ao estresse oxidativo, devido à ausência de correlações MT x GSH;
- Foi observada que a excreção biliar de MT pode ser usada como alternativa para indicar exposição a metais em *G. brasiliensis*, ao invés do fígado;
- Diversas correlações estatisticamente significativas foram observadas entre os metais determinados, o IHS, o FC, a GSH e a MT, indicando efeitos dos metais nestes parâmetros morfométricos e bioquímicos;
- A análise de fígados na espécie *G. brasiliensis*  mais adequada para averiguar diferenças na bioacumulação de metais em função da estação do ano;
- As diversas correlações estatisticamente significativas observadas entre o IHS, o FC e a GSH indicam que estes parâmetros estão intrinsecamente ligados, e devem, portanto, ser analisados mais a fundo, levando em conta esforços reprodutivos em futuros estudos para evitar interpretações errôneas dos dados;
- Os cálculos relativos ao consumo máximo diário realizados indicam que os níveis máximos estipulados são significativamente ultrapassados além de diversos metais encontrarem-se acima dos níveis permissíveis em alimentos estipulados por legislações nacionais e internacionais, indicando assim, altos riscos aos consumidores humanos, que não devem ser ignorados.

6 – Futuros estudos

Futuros passos incluem a realização de comparações sazonais entre fígado e bÍlis para verificar qual seria a matriz adequada a ser utilizada na averiguação das diferenças na bioacumulação de metais em função da estação do ano.

Além disso, o comportamento de ligação das MT com os diferentes isótopos monitorados podem e devem ser investigados por outras técnicas bioanalticas, como por exemplo, acoplamento de HPLC com ICP-MS, para investigar a expressão de metaloproteinas em *G. brasiliensis*.

Coletas de água também serão realizadas em conjunto com as coletas de peixe, para possibilitar a investigação das relações dos níveis de metais na água com os níveis observados nos peixes, assim como a especiação de mercúrio.

REFERÊNCIAS

ABELHA, C. F. M.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (OSTEICHTHYES, CICHLIDAE) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 37-45, 2004.

ADAMS, M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda: 2002. 644.

AGOSTINHO, A. A. et al. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. **Ciencia e Cultura**, v. 42, n. 9, p. 711-714, 1990.

ALBUQUERQUE, C. **Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação na Baía de Guanabara**. 2007. 81p. (Mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

ALVES, D. T. M. et al. Qualidade ambiental da lâmina d'água da Lagoa Rodrigo de Freitas - RJ. Subsídios aos estudos de impactos ambientais em lagoas costeiras. In: KRUG, T.; RUDORFF, B. F. T., et al, 9th Brazilian Symposium of Remote Sensing, 1998, São José dos Campos. p.79-88.

ANDREATA, J. V. Reprodução e alimentação de algumas espécies de peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 501-524, 2012.

ANDREATA, J. V. et al. Peixes pelágicos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, p. 25-31, 2004.

ARAÚJO, F. G. et al. Variações espaciais na assembléia de peixes do rio Paraíba do Sul (Barra Mansa, Barra do Piraí), Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 483-492, 2001.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1):61-72, 2007., v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

BARBER, L. B. et al. Reproductive responses of male fathead minnows exposed to wastewater treatment plant effluent, effluent treated with XAD8 resin, and an environmentally relevant mixture of alkylphenol compounds. **Aquatic Toxicology**, v. 82, p. 36-46, 2007.

BARBIERI, G. **Crescimento do *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard) na Represa do Lobo**. 1974. 111p. (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

_____. Dinâmica da reprodução e crescimento de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) da represa do Monjolinho, São Carlos/SP. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 2, p. 225-233, 1989.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, F. F. **Isoenzimas de Glutation S-transferases como biomarcadores de intoxicação subletal em peixes mugilídeos**. 2006. 75p. (Mestrado). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BENINÇÁ, C. **Biomonitoramento das Lagoas Estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta - Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE)**. 2006. 112p. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

BERRY, J. P. et al. Bioaccumulation of microcystins by fish associated with a persistent cyanobacterial bloom in Lago De Patzcuaro (Michoacan, Mexico). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 1621-1628, 2011.

BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. **Environmental Pollution**, v. 126, n. 1, p. 9-19, 2003.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods**. 2nd. New York: Grune and Stratton, 1975. 546.

BRAGA, F. M. S. Estudo entre o fator de condição e relação peso/comprimento para alguns peixes marinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 2, p. 339-346, 1986.

BRASIL. Apparent Per Capital Consumption of Fish in Brazil 1996-2009., 2009.

BRAZIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 55.871, 26 de março de 1965. 1965.

BRYMAN, A.; CRAMER, D. **Quantitative data analysis with IBM SPSS Statistics 17, 18 and 19: A guide for social scientists**. Hove: Psychology Press, 2011. 377.

BUNTON, T. E.; FRAZIER, J. M. Extrahepatic Tissue Copper Concentrations in White Perch with Hepatic Copper Storage. **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 4, p. 627-640, Oct 1994. ISSN 0022-1112. Disponível em: < <Go to ISI>://A1994PN51500007 >.

CALMANO, W.; FOSTER, U.; JHONG, J. Mobilization and scavenging of heavy metals following resuspension of anoxic sediments from the Elbe river. In: ALPERS, C. N. e BLOWES, D. W. (Ed.). **Environmental Geochemistry of Sulfie Oxidation**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994. p.298-321.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 1, p. 129-136, 2003.

CARVALHO, M. L. S., S.; NUNES, M. L. Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 2, p. 426-432, 2005.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes da Costa Brasileira**. São Paulo: Melro, 1999. 320.

CENSI, P. et al. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. **Chemosphere**, v. 64, n. 7, p. 1167-1176, Aug 2006. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<Go to ISI>://000240157100015 >.

CLEMENTS, W. H.; REES, D. E. Effects of Heavy Metals on Prey Abundance, Feeding Habits, and Metal Uptake of Brown Trout in the Arkansas River, Colorado. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 5, p. 774-785, 1997.

CONDESSA, S. S. **Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação da vitamina C em *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) machos adultos e potencial biossorbitico da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.)**. 2014. 204p. (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DA FONSECA, E. M. et al. **The Role of the Humic Substances in the Fractioning of Heavy Metals in Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro – Brazil**. 2013. (85). Anais da Academia Brasileira de Ciências,

DAGA, J. A. et al. Fatores abióticos que influenciam a reprodução de cará *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), no reservatório de Salto Santiago, Rio Iguaçu, Paraná. In: BUZZI, A. H., II Simpósio Nacional em Engenharia de Pesca, 2010, Toledo. p.1-4.

DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3-4, p. 235-244, 2002.

DE JESUS, T. B.; DE CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg) **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

DE LIMA, C. A. I.; VIEGAS, M. O.; BERNSTEIN, A. O impacto da urbanização em Lagoas do Rio de Janeiro: estudo de caso sobre as Lagoas Rodrigo de Freitas e de Araruama. **Educação Pública**, p. 1-1, 2014.

DETHLOFF, G. M.; BAILEY, H. C.; MAIER, K. J. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 371-380, 2001.

DIJKSTRA, M. et al. Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems. **Life Sciences**, v. 59, n. 15, p. 1237-1246, Sep 6 1996. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://A1996VH23800007 >.

DOMINGOS, P. et al. Eventos de mortandade de peixes associados a florações fitoplanctônicas na Lagoa Rodrigo de Freitas: programa de 10 anos de monitoramento. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 441-466, 2012.

DONDERO, F. et al. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. **Gene**, v. 345, p. 259-270, 2005.

DOS SANTOS, D. R. **Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna**. 2013. 92p. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

EASTWOOD, S.; COUTURE, P. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. **Aquat Toxicol**, v. 58, n. 1-2, p. 43-56, Jul 2002. ISSN 0166-445X. Disponível em: < <Go to ISI>://000175544700004 >.

EC. Commission regulation no. 466/2001 of 8 March 2001. **Official Journal of the European Community**, v. 1.77/1, 2001.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

ERK, M. et al. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**, v. 57, n. 6, p. 1211-1218, 2002.

ESPINO, G. L.; PULIDO, S. H.; PÉREZ, J. L. C. **Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)**. México: Plaza y Valdés S.A., 2000. 633.

ESTEVES, F. A. et al. Neotropical coastal lagoons: An appraisal of their biodiversity, functioning, threats and conservation management. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 967-981, 2008.

FAO. FAO fishery circular No. 464, 5-100. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome., 1983.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods. **Codex Alimentarius CF/5 INF/1**, p. 1-90, 2011.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat

- Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun river. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158-165, 2007.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, D. G. **Análise genética da espécie neotropical brasiliensis (Osteichthyes: Cichlidae)**. . 2013. 123p. (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- FERREIRA JUNIOR, M. G. F. et al. Indicações para administração sustentável da pesca na lagoa Rodrigo de Freitas, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 163-166, 2003.
- FERREIRA, M. S. **Contaminação mercurial em pescado capturado na Lagoa Rodrigo de Freitas**. 2006. 100p. (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1978. 110.
- GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, Rio Grande - MG/SP. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 79-86, 2003.
- GROSELL, M. H.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C. M. Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 257-276, 1997.
- GUPTA, N. et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclicpeptide toxin microcystin variants (LR,RR, YR) in mice. **Toxicology**, v. 188, p. 285-296, 2003.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.
- HAMER, D. H. Metallothionein. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 55, p. 913-951, 1986.
- HANDY, R. D. Dietary exposure to toxic metals in fish. . In: TAYLOR, E. W. (Ed.). **Toxicology of Aquatic Pollution**. Cambridge: Cambridge University Press., 1996. p.29-60.
- HAUSER-DAVIS, R. A. **Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli***. 2008. 128p. (Mestrado). PUC-Rio, Rio de Janeiro.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Fish bile as a biomarker for metal exposure. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 1589-1595, 2012.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1, p. 70-74, 2014.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**, v. 116-117, p. 54-60, 2012.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Alterations in Morphometric and Organosomatic Indices and Histopathological Analyses Indicative of Environmental Contamination in Mullet, *Mugil liza*, from Southeastern Brazil **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 1154-1160, 2012.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New York: John Wiley & Sons, 2004. p.319-368.

HUNG, D. Q.; NEKRASSOVA, O.; COMPTON, R. G. Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review. **Talanta**, v. 6, n. 2, p. 269-277, 2004.

KAGI, J. H. R. Overview of metallothionein. In: RIERDAN, J. F. e VALLEE, B. L. (Ed.). **Methods of enzymology: Metallobiochemistry: Metallothionein and related molecules**. San Diego: Academic Press, v.250, 1991. p.613-626.

KALNEJAIS, L. H. et al. Role of sediment resuspension in the remobilization of particulate-phase metals from coastal sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 2822-2288, 2007.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: 2004. 211.

KJERFVE, B. **Coastal Lagoon Processes**. London: Elsevier Science Publishers, 1994. 577.

KLAASEN, C. D.; WATKINS, J. B. Bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. **Pharmacological reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-67, 1984.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Jundiaí: Degaspari, 1999. 14-65.

KULLANDER, S. O. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. In: KULLANDER, S. O. e FERRARIS JR, C. J. (Ed.). **Family Cichlidae (Cichlids)**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.605-654.

LAFLAMME, J. S. et al. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. **Can J Fish Aquat Sci**, v. 57, n. 8, p. 1692-1700, Aug 2000. ISSN 0706-652X. Disponível em: <<Go to ISI>://000088273200016 >.

LAVRADAS, R. T. et al. Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna perna* mussels in two environmentally impacted tropical bays in southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 75-84, 2016.

LIÑÁN-CABELLO, M. A. et al. Effects of carotenoids and retinol in oocytes maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 905-911, 2004.

LOHNER, T. W. et al. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents — 1. Hematological and population level assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 203-216, 2001.

LOUREIRO, D. et al. Distribuição dos metais pesados em sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 353-364, 2012.

LOUREIRO, D. D. **Evolução dos aportes de metais pesados numa lagoa costeira hipertrófica urbana - Lagoa Rodrigo de Freitas**. 2004. 119p. (Monografia). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LOUREIRO, D. D.; LACERDA, L. D.; LOURENÇO, C. A. O mercúrio e os jogos pan-americanos de 2007. **Revista Ciência Hoje**, v. 48, p. 40-43, 2011.

LOUREIRO, D. D.; LOURENÇO, C. A.; LACERDA, L. D. Efeitos da dragagem na distribuição espacial de mercúrio no sedimento superficial da lagoa Rodrigo de Freitas. II Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2008, Fortaleza. AOCEANO – Associação Brasileira de Oceanografia. p.1-3.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Fish Communities in tropical Freshwaters: Their Distribution, Ecology and Evolution**. London: Longman, 1975. 337.

LUNARDELLI, B.; MARTINEZ, C. B. R. Alterações bioquímicas no tecido renal do peixe *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao alumínio. XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica, 2009, Londrina. p.1-4.

MACHADO, R. A. **Avaliação genotóxica em *Geophagus brasiliensis* expostos a cultura de arroz no município de Araranguá - SC através do teste de micronúcleos**. 2007. 42p. (Monografia). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

MARCA, A. G.; ANDREATA, J. V. Estrutura da comunidade de peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas. In: V., A. J. (Ed.). **Lagoa Rodrigo de Freitas – síntese histórica e ecológica**. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Ed. Universidade Santa Úrsula, 2001. p.77-142.

MARTIN, L. K.; BLACK, M. C. Biomarker assessment of the effects of petroleum refinery contamination on channel catfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, p. 81-87, 1996.

MCALLISTER, D. E.; HAMILTON, A. L.; HARVEY, B. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. **Sea Wind**, v. 11, p. 1-140, 1997.

MENICONI, M. F. G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em biles de peixes**. 2007. 213p. (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

MONTEIRO, E. R. S.; CASTRO, P. M. G.; MARUYAMA, L. S. Reprodução e estrutura populacional de *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório Billings - alto Tietê, SP. V Seminário De Iniciação Científica Do Instituto De Pesca, 2010, Santos. p.11-11.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. 601.

NORRIS, D. O. et al. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 127, p. 71-78, 2000.

NRC. Biological Effects of Oil Releases, Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects, Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects. In: (Ed.). Washington, D.C.: The National Academies Press, 2003. p.119-157.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. et al. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53-69, 2005.

PALMITER, R. D. The elusive function of metallothioneins. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 95, p. 8428-8430, 1998.

PETES, L. E.; MENGE, B. A.; HARRIS, A. L. Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. **Ecological Monographs**, v. 78, n. 3, p. 387-402, 2008.

PFEIFFER, W. C. et al. Metais pesados no pescado da Baía de Spetiba, estado do Rio de Janeiro, RJ. **Ciencia e Cultura**, v. 37, n. 2, p. 297-302, 1985.

POWERS, D. A. Fish as Model Systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (OSTEICHTHYES, LORICARIIDAE), Bacia do Rio Uruguai médio, sul do Brasil. **Série Zoológica**, v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

RAMOS, G.; ALVES, A. L.; HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal. In: EL-HANI, C.N.; VIDEIRA, A.A.P. (eds). O que é vida: para entender a biologia do século XXI. . p. 209-231, 2000.

RODGER, H. D. et al. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout *Salmo trutta* L. in loch Leven, Scotland. **Journal of Fish Diseases**, v. 17, p. 177-181, 1994.

SANTOS, A. B. **Concentrações de elementos químicos em fígado e músculo de peixes demersais do sistema estuarino de Santos-Cubatão (SP): aspectos temporal e espacial**. 2011. 111p. (Mestrado). Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SAULNIER, I.; MUCCI, A. Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. **Applied Geochemistry**, v. 15, p. 203-222, 2000.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 48-53, 1999.

SELINUS, O. Geologia médica. In: SILVA, C. R.; FIGUEIREDO, B. R., *et al* (Ed.). **Geologia médica no Brasil: efeitos dos materiais e fatores geológicos na saúde humana, animal e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CPRM - Serviço Geológico do Brasil, 2006. p.220.

SOFFIATI, A. Aspectos históricos das lagoas do Norte do Estado do Rio de Janeiro. In: ESTEVES, F. A. (Ed.). **Ecologia de Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)**. Rio de Janeiro, 1998. p.464.

SZEFER, P. et al. Distribution and coassociations of trace elements in soft tissue and byssus of *Mytilus galloprovincialis* relative to the surrounding seawater and suspended matter of the southern part of the Korean Peninsula. **Environmental Pollution**, v. 129, n. 2, p. 209-228, May 2004. ISSN 0269-7491. Disponível em: <<Go to ISI>://000220279400005 >.

USFDA. Food and Drug Administration. Guidance Document for metals in Shellfish. DHHS/PHS/FDA/CFSAN/Office of Seafood, Washington, DC. 1993.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 57-149, Feb 2003. ISSN 1382-6689. Disponível em: <<Go to ISI>://000180555100001 >.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. . Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, EDUEM SBI: 1981.

VIARENGO, A. et al. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 1997.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. . **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 281–300, 2007.

VONO, V. **Estrutura da comunidade de peixes e de seus habitats na região litorânea de dois lagos no médio rio Doce, MG**. 1995. 70p. (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VUORINEN, P. J. et al. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 8-9, p. 479-487, 2006.

WILHELM-FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). . **Aquaculture**, v. 244, n. 1-4, p. 349-357, 2005.

WILSON, R. P.; CORRAZE, G. Foreword - Nutrition and feeding of fish. **Aquaculture**, v. 267, n. 1-4, p. 1-2, Jul 3 2007. ISSN 0044-8486. Disponível em: <Go to ISI>://000248071300001 >.

WOOD, S. A. et al. Hindcasting cyanobacterial communities in Lake Okaro with germination experiments and genetic analyses. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 67, p. 252–260, 2009.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. O. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.

ZHANG, D. W. et al. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2191-2199, 2009.