

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CINTHIA ELOISE DOMINGUES

DETERMINAÇÃO DE METAIS EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), ÁGUA E
SEDIMENTO DE UM RESERVATÓRIO NA CIDADE DE PONTA GROSSA- PR E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA POR ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO

PONTA GROSSA
2015

CINTHIA ELOISE DOMINGUES

DETERMINAÇÃO DE METAIS EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), ÁGUA E
SEDIMENTO DE UM RESERVATÓRIO NA CIDADE DE PONTA GROSSA- PR E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA POR ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Química Aplicada no Programa de
Pós-Graduação em Química Aplicada da
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos
Co-orientadora: Profa. Dra. Elaine Regina Lopes
Tiburtius

PONTA GROSSA
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D671 Domingues, Cinthia Eloise
Determinação de metais em Tilápia
(*Oreochromis niloticus*), água e sedimento
de um reservatório na cidade de Ponta
Grossa- PR e avaliação toxicológica por
estudo de estresse oxidativo/ Cinthia
Eloise Domingues. Ponta Grossa, 2015.
74f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Xavier de
Campos.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Elaine Regina
Lopes Tiburtius.

1.Determinação de metais. 2.Tilápia.
3.Estresse oxidativo. I.Campos, Sandro
Xavier de. II. Tiburtius, Elaine Regina
Lopes. III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Química Aplicada. IV.
T.

CDD: 597.583.4

TERMO DE APROVAÇÃO

CINTHIA ELOISE DOMINGUES

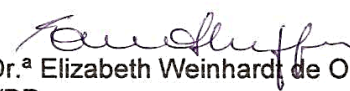
***“DETERMINAÇÃO DE METAIS EM TILÁPIA (*Oreochromis
niloticus*), ÁGUA E SEDIMENTO DE UM RESERVATÓRIO NA
CIDADE DE PONTA GROSSA – PR E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA POR ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO.”***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos
UEPG/PR


Prof. Dr. Ciro Alberto Oliveira Ribeiro
UFPR /PR


Prof.ª Dr.ª Elizabeth Weinhardt de Oliveira Scheffer
UEPG/PR

Ponta Grossa, 06 de novembro de 2015.

Dedico

Aos meus Pais Leocádia e Edson Luiz Domingues,

Ao meu irmão Jonathan Luiz Domingues,

Ao meu amor Januário Kordiak,

Por serem o alicerce em minha vida,

pelo apoio e carinho incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e Nossa Senhora Aparecida, pela força nas dificuldades, pelo amparo na angústia e pelas alegrias da vida.

À minha família pela estrutura, apoio e amor sem limites.

Ao meu namorado pelo apoio, incentivo e companheirismo em todas as etapas deste trabalho, principalmente na coleta de amostras.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos, pela confiança, amizade, incentivo e oportunidade para realizar este mestrado.

Ao Clube Ponta-Lagoa pela parceria e incentivo na realização deste trabalho, demonstrando sua preocupação com as causas ambientais.

À minha amiga de vida e de grupo Tatiana R. de Oliveira Stremel, por ter dedicado grande parte do seu tempo para me ensinar, ajudar e principalmente por sua amizade.

Aos meus amigos do Grupo de Química Analítica Ambiental e Sanitária (QAAS), Rosi, Cleber e Carmen por todos os momentos de descontração, apoio e amizade. Cleber, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao colega Dandie Bozza e Prof. Dr. Ciro A. de O. Ribeiro pela parceria e ajuda na amostragem desta pesquisa.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (CLABMU) pela disponibilização do espectrômetro de absorção atômica, e à técnica Rachel Govea por sua disponibilidade e cooperação.

Aos pescadores Antonio Vantelino Macedo e Marcos Almeida, pela pesca dos peixes utilizados neste estudo.

Aos coletores de sedimento Januário Kordiak e Protásio André Stremel Junior.

À CAPES pelo financiamento de bolsa de estudos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Sou daqueles que pensam que a ciência tem grande beleza.

Um cientista em seu laboratório não é só um cientista: ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que lhe impressionam como um conto de fadas.

Marie Curie

RESUMO

Para avaliar o impacto em potencial de metais tóxicos em um lago da cidade de Ponta Grossa – PR, este trabalho determinou e quantificou por espectrometria de absorção atômica a concentração dos metais Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em água, sedimento, músculo e fígado de peixe da espécie *Oreochromis niloticus*. Além disso avaliou o impacto dos metais no fígado de peixes através do estudo de estresse oxidativo. Nas amostras de água do lago foi determinada a presença de Co, Mn e Ni em sua fração dissolvida. No sedimento do lago encontrou-se concentrações para os metais que variaram de $4,6 \pm 0,9$ a $865,5 \pm 38,2$ mgKg^{-1} . As concentrações encontradas para Cd ($4,6 \pm 0,9$ mgKg^{-1}), Cu ($141,9 \pm 5,1$ mgKg^{-1}) e Pb ($53,4 \pm 6,6$ mgKg^{-1}) representam risco potencial aos organismos expostos, pois situam-se entre os índices de NEL (nível de efeito limiar) e NEP (nível de efeito provável). O metal Zn apresentou concentração acima de NEP, indicando que ele pode estar diretamente relacionado aos efeitos biológicos adversos. As concentrações de Ni ($5,4 \pm 0,4$ mgKg^{-1}) e Pb ($24,4 \pm 2$ mgKg^{-1}) no músculo de *Oreochromis niloticus* encontram-se acima do valor estipulado pela ANVISA (Ni - $5,0$ mgKg^{-1} , Pb - $0,3$ mgKg^{-1}) para consumo humano, indicando que há contaminação da espécie em estudo por tais metais, bem como risco à saúde humana ao se consumir esses peixes. As concentrações de metais potencialmente tóxicos no fígado foram mais altas em relação as concentrações encontradas no músculo, indicando maior afinidade entre os metais e o fígado do que os metais e o músculo, fato que foi confirmado também pelo fator de bioacumulação, onde os valores para fígado são maiores em relação aos valores para o músculo. Tanto para o fígado ($89,52 \pm 2,59$ mgKg^{-1}) como para o músculo ($33,4 \pm 6,9$ mgKg^{-1}) o metal com maior concentração encontrado foi o Zn, essa maior concentração foi observada também para o sedimento, indicando a contaminação do peixe devido ao contato com o sedimento. Os ensaios biológicos mostraram aumento nos níveis de peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e aumento na GSH, bem como a relação através da análise agrupamento hierárquico (HCA) dos metais com a metalotioneína (MT). A partir disso conclui-se que os metais além da contaminação da água e sedimento estão influenciando negativamente os espécimes de *Oreochromis niloticus* desse lago.

Palavras-chave: Determinação de Metais, Tilápia, Estresse oxidativo

ABSTRACT

The present work determined to evaluate the impact of potentially toxic metals in the lake of Ponta Grossa - PR and quantified through the atomic absorption spectrometry. To identified the concentration of metals such as Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in water, sediment, *Oreochromis niloticus* muscle, liver of fish. Moreover also determined the impact of metals in fish's liver by the study of oxidative stress. In all water samples were determined that, the presence of Co, Mn and Ni metals in a dissolved fraction. In the sediment met for metals concentrations ranging from 4.6 ± 0.9 to $865.5 \pm 38.2 \text{ mgKg}^{-1}$. The observed concentrations of Cd ($4,6 \pm 0,9 \text{ mgKg}^{-1}$), Cu ($141,9 \pm 5,1 \text{ mgKg}^{-1}$) and Pb ($53,4 \pm 6,6 \text{ mgKg}^{-1}$) represented that, the potential danger to exposed organisms, nevertheless the results were between the index TEL (threshold effect level) and PEL (probable effect level). In fact, Zn metal showed concentration above PEL indicated that, it can be directly related to the adverse biological effects. In addition, Ni ($5,4 \pm 0,4 \text{ mgKg}^{-1}$) and Pb ($24,4 \pm 2 \text{ mgKg}^{-1}$) metals concentration in *Oreochromis niloticus* muscle were above the value stipulated by ANVISA (Ni - $5,0 \text{ mgKg}^{-1}$, Pb - $0,3 \text{ mgKg}^{-1}$) for human consumption suggested, the contamination of the species as well as a risk to human's health when they consume these fish. Moreover, potentially toxic metals concentration in the liver was higher than the concentration observed in muscle indicated that, the greater affinity between metals and liver than the metals and muscle. Such fact was confirmed by the bioaccumulation factor, once the values of liver were higher than the values of muscle. Both the liver ($89,52 \pm 2,59 \text{ mgKg}^{-1}$) and muscle ($33,4 \pm 6,9 \text{ mgKg}^{-1}$) showed highest concentration of Zn metal. This concentration was increased in the sediment revealed that, the contamination of fish occurred due to the contact with sediment. Apart from these, the biological data showed that, increased levels of lipid peroxidation, carbonylation protein and increased in GSH and the ratio by Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of metals metallothionein (MT).

Based on the above, concluded that, the metals contaminants the water and sediment. Besides, the metals has negatively influence on the *Oreochromis niloticus* species from lake.

Keywords: Metal Determination, Tilapia, Oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de absorção da radiação eletromagnética	21
Figura 2 - Principais componentes de um espectrômetro de absorção atômica	22
Figura 3 – Contaminação por metais e a relação biológica.....	33
Figura 4 - Mapa da região e lagoa da coleta.....	36
Figura 5 - <i>Oreochromis niloticus</i>	38
Figura 6 - Amostragem do fígado e músculo da Tilápia.....	38
Figura 7– a) Coletor de sedimento. b) Coleta de amostra de sedimento.....	39
Figura 8– Concentração de metais totais e biodisponíveis em sedimento	52
Figura 9- Concentração do metal Zn em amostras de fígado e músculo	57
Figura 10 – Concentração do metal Co em amostras de fígado e músculo	57
Figura 11 – Concentração do metal Pb em amostras de fígado e músculo	58
Figura 12 – Concentração do metal Ni em amostras de fígado e músculo	58
Figura 13 - Concentração de tióis não proteicos.....	60
Figura 14 - Atividade da Glutathione S-transferase.....	60
Figura 15 - Peroxidação lipídica.....	61
Figura 16 - Carbonilação de proteínas.....	61
Figura 17 – Análise por agrupamento hierárquico dos metais no fígado e bioensaios.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Utilização de metais em produtos consumíveis pela população	17
Tabela 2 - Chamas utilizadas em Espectroscopia Atômica.....	23
Tabela 3 – Utilização de Espectrometria de absorção atômica para determinação de metais potencialmente tóxicos.....	24
Tabela 4 - Parâmetros instrumentais para as medidas por EAAC	41
Tabela 5 - Concentrações médias e recuperação dos metais encontrados nas amostras de material de referência certificado e limite de quantificação (n=2)	47
Tabela 6 – Concentração de metais em amostra de água previamente filtrada e não filtrada..	48
Tabela 7 – Concentração de metais totais e biodisponíveis em amostra de sedimento	49
Tabela 8 – Concentração de metais em músculo e fígado de Tilápia e limites aceitáveis pela ANVISA para músculo	53
Tabela 9 – Concentração de metais em amostras de fígado de Oreochromis niloticus	55
Tabela 10 – Fator de bioacumulação para sedimento e água	59

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EAAC	Espectrômetro de absorção atômica de chama
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBA	Fator de Bioacumulação
GSH	Glutathione
GST	Glutathione – S - transferase
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
IPM	Índice de poluição por metais
LPO	Lipoperoxidação
LQ	Limite de quantificação
MT	Metalotioneína
MRC	Material de referência certificado
NEL	Nível de efeitos limiar
NEP	Nível de efeitos prováveis
PCO	Carbonilação de proteínas
USEPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	CARACTERÍSTICAS DOS METAIS ESTUDADOS	14
2.2	DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	18
2.3	PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	18
2.4	ANÁLISE DA AMOSTRA.....	20
2.5	DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SEDIMENTO E ÁGUA.....	24
2.6	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS SEDIMENTOS	26
2.6.1	Índice por poluição de metais (IPM)	26
2.6.2	Nível de efeito Limiar (NEL) e Nível de efeito provável (NEP).....	27
2.7	DETERMINAÇÃO DE METAIS EM <i>Oreochromis niloticus</i>	28
2.7.1	Bioacumulação	30
2.8	ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR METAIS	30
3	OBJETIVOS	35
3.1	GERAIS.....	35
3.2	ESPECÍFICOS	35
4	PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1	- ÁREA DE ESTUDO.....	36
4.2	AMOSTRAGEM	37
4.2.1	Materiais	37
4.2.2	Peixe	37
4.2.3	Sedimento	39
4.2.3	Água	39
4.3	PREPARO DE AMOSTRA	40
4.3.1	Água	40
4.3.2	Sedimento e Peixe	40
4.4	DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS	41
4.5	ÍNDICE DE POLUIÇÃO POR METAIS (IPM)	42
4.6	FATOR DE BIOACUMULAÇÃO (FBA).....	42
4.7	Nível de efeito limiar (NEL) e Nível de efeito provável (NEP)	43
4.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS	43
4.8.1	Determinação da glutathione S-transferase, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas	43
4.8.2	Determinação de metalotioneínas	44
4.8.3	Determinação de glutathione reduzida	44

4.8.4 Quantificação de proteínas totais	45
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 – TESTE DE EXATIDÃO DO MÉTODO EMPREGADO	46
5.2 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	47
5.3 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO.....	49
5.4 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE <i>Oreochromis niloticus</i> (TILÁPIA).....	53
5.4.1 Fator de bioacumulação (FBA) para água e sedimento	59
5.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR METAIS EM <i>Oreochromis niloticus</i>	60
6 CONCLUSÃO	64
REFERENCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Metais são elementos naturais em que alguns são essenciais para os seres vivos, sendo obrigatórios para o metabolismo dos seres vivos e outros são não essenciais, podendo comprometer este metabolismo, apresentando distintos graus de toxicidade. Os metais não essenciais podem ser encontrados no ambiente, porém em concentrações extremamente baixas e, o aumento da concentração desses metais pode ser resultado de ação antrópica (MASSABNI, A. C. 2006).

Os metais potencialmente tóxicos existem em águas superficiais associado a coloides, material particulado e na fração dissolvida, em baixas concentrações (KENNISH, 1992; CONNELL et al., 1984 como cita PINTILIE, S. et. al. 2007).

Devido a processos químicos, físicos e biológicos a maior parte dos metais dissolvidos encontra-se associado aos sedimentos, e ficam estocados por longos períodos até que sejam reintroduzidos no ambiente aquático.

Sedimentos tornam-se depósitos de contaminantes, por consequência da deposição da degradação, erosão de minerais, materiais orgânicos e solos que favorecem a ligação de contaminantes nos mesmos (SEDNET, 2004 p.25-28; ZHANG, C. et.al, 2014 p.271; TESSIER, A. CAMPBELL, P. G. C. 1987 p.43-45; PINTILIE, S. et. al. 2007; OWENS. P. N. 2008 p.3-9).

Peixes são considerados indicadores ideais para determinação de contaminação ambiental, pois estão em contato direto com o meio contaminado (água e sedimento) através da pele, sistema respiratório e alimentação. (ERICKSON, R. J. et.al. 2008 p.09; VAN DER OOST, R. et al, 2003 p.65). A espécie *Oreochromis niloticus*, conhecido como tilápia, é considerada bom indicador de contaminação por metais pois possui a característica de

adaptar-se facilmente em ambientes com baixa qualidade de água (POPMA, T. MASSER, M. 1999; HEIN, G. BRIANESE, R. H. 2004 p. 10; FAO, 2013).

Uma vez que os metais entram no organismo eles podem ser excretados ou estocados, tal processo é chamado de bioacumulação, o qual é determinado pelo fator de bioacumulação.

A bioacumulação é a proporção da concentração de uma substância no tecido de um organismo aquático e a sua concentração na água ou sedimento do ambiente, em situações em que tanto o organismo e sua comida são expostas e a relação não altere substancialmente ao longo do tempo (USEPA. 2000, p. 29-30).

Metais são conhecidos como indutores de estresse oxidativo. A avaliação dos danos oxidativos e defesas antioxidantes podem refletir a contaminação por metal do ambiente aquático (MAHBOOB, S, 2013 p. 337).

Lagos introduzidos no ambiente urbano principalmente próximos de indústrias, são importantes locais para estudo de contaminação por metais, pois as fábricas são as origens antrópicas primárias de metais no ambiente aquático, além de que os metais podem ficar depositados nos solos em torno do reservatório entrando no ambiente aquático por escoamento (WANG, G. et.al. 2015 p. 38).

O presente trabalho tem por objetivo determinar e quantificar os metais potencialmente tóxicos, Cd, Cr, Cu, Co, Mn, Ni, Pb e Zn, em diferentes matrizes, tais como tecidos de *Oreochromis noluticus* (fígado e músculo), sedimento e água, bem como investigar a bioacumulação desses metais avaliando o impacto causado através de análises de estresse oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DOS METAIS ESTUDADOS

Os metais em sua forma iônica podem ser muito reativos, interagindo com o sistema biológico de várias maneiras. Uma célula está relacionada com metais que são essenciais para o metabolismo, no entanto, metais podem ocupar o lugar de outro elemento essencial fazendo com que ocorra um rearranjo alterando a função da biomolécula. A inibição da atividade enzimática pela interação com metal em sítios ativos é considerado um mecanismo importante de efeitos toxicológicos dos metais (KASPRZAK, 2002 como cita LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.934.).

Alguns metais e metaloides são elementos eletropositivos que geralmente causam efeitos tóxicos, como cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco (USEPA, 2012).

O Cádmio pode ser absorvido pelo organismo pela alimentação, mas a maior fonte de exposição é via sistema respiratório. É encontrado como subproduto da fundição de zinco, chumbo e cobre. Utilizado em baterias, pigmentos, estabilizadores para plásticos, ligas não ferrosas, dispositivos fotovoltaicos. Peixes bioacumulam cádmio nas guelras, fígado e rim, a presença desse metal leva a síntese de metalotioneína que complexa e inativa o metal quando em determinadas concentrações (ATSDR, 2007; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.940; CARDOSO, L. M. N. CHASIN, A. A.M. 2001 p. 47).

O Chumbo foi um dos primeiros metais usados pelo homem. Pode ser obtido de fontes primárias (mineração), ou por fontes secundárias (reciclagem de baterias de chumbo). É utilizado em ligas metálicas para tubulação, baterias, pesos, munição, escudos de proteção de radiação.

Já foi bastante usado como aditivo em gasolina para aumentar a octanagem, em tintas, corantes, esmaltes cerâmicos, mas seu uso tem sido proibido ou reduzido devido à

exposição proporcionada ao ambiente. A exposição pode ser através da inalação de partículas presentes no ar ou através da ingestão de alimentos e líquidos. Nos peixes, o chumbo se acumula principalmente nas brânquias, fígado rins e ossos (ATSDR, 2007 p. 2-8; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.944; PAOLIELLO, M.M. B. CHASIN, A. A.M. 2001 p. 60.).

O Cobalto é usado em ligas metálicas gerando resistência ao desgaste e corrosão, essas ligas são empregadas em aplicações militares e industriais em motores de aeronaves, ímãs, e ferramentas de moagem e corte. Possui propriedades radioativas, que são usadas como fonte de raios gama para esterilizar equipamentos médicos ou produtos de consumo, irradiação de alimentos, radioterapia para o tratamento de pacientes com câncer, e para fabricação de plásticos.

Geralmente obtido como subproduto de mineração do cobre e do níquel, é considerado metal essencial, no entanto, com potencial tóxico dependendo da concentração. Contudo, por exposição via ambiente ou por tratamento de saúde, doses elevadas de cobalto podem causar bócio, aumento da pressão sanguínea e dificuldade respiratória (ATSDR, 2004 p. 2-4; 17-18; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.951-952).

O Cromo é utilizado para fabricação de ligas metálicas, utilizadas por exemplo na produção de aço inoxidável. Seus compostos são aplicados no tratamento de madeira, curtição de couro, painéis de aço inoxidável. As vias de exposição ao cromo são através da inalação, alimentação e contato com a pele.

O Cromo em seu estado trivalente é considerado um micronutriente para o metabolismo da glicose, no entanto não há doença reconhecida devido a deficiência deste metal, porém em seu estado hexavalente causa danos aos seres vivos. Quando o cromo hexavalente entra nas células ocorre uma redução intracelular para cromo trivalente, porém durante este processo ocorre danos nos componentes celulares incluindo a geração de radicais

livres (ATSDR, 2012 p. 2-3, 9-10; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.942-943).

O Cobre é largamente utilizado ao redor do mundo, principalmente como liga metálica para fabricação de arame, chapas tubos, fiação elétrica, joias. Seus compostos são usados na agricultura para tratar doenças de plantas, conservante de madeira, couro e tecidos.

Considerado um micronutriente como componente essencial de metaloenzimas. Está disposto no ambiente como um todo, logo a exposição pode ocorrer por várias vias. Nos peixes o cobre é absorvido através de difusão facilitada, o excesso de metal é excretado ou acumulado ligado a proteínas como a metalotioneína (ATSDR, 2004 p. 6-7; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.952-953).

O Manganês é um importante micronutriente para funções metabólicas e celulares. Além disso, é também utilizado para melhorar as propriedades do aço, fogos de artifício, pilhas secas, fertilizantes, tintas, cosméticos, medicamento para melhorar detecção de lesões por ressonância magnética, suplementos nutricionais. Contudo, em quantidades excessivas prejudica processos vitais.

A inalação de manganês é a maior fonte de contaminação, pois ocorre transferência direta para o cérebro, sem que ocorra a metabolização pelo fígado. (ATSDR, 2012 p. 5; 11-14; LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. 2008 p.955-956).

O Níquel é utilizado para formar ligas metálicas, que são usadas na fabricação de moedas, joias e também nas indústrias (na fabricação de válvulas e trocadores de calor, aço inoxidável, revestimento, coloração de cerâmicas, baterias e catalisadores).

Vias de exposição são a alimentação e também o contato com a pele. Reações alérgicas são sinais do contato do níquel com a pele. Em peixes expostos a concentrações de níquel, houve indução da produção de metalotioneína (ATSDR, 2005 p. 1-6; PALERMO, F. F. 2012).

O zinco é utilizado em processos de galvanização, baterias de celulares. Já os compostos de zinco são usados na fabricação de tintas brancas, cerâmicas, produção de borracha, preservação de madeira, fumaça de bombas de fumaça, suplementos alimentares, pomadas, desodorantes, shampoo anti-caspa, entre outros.

A rota de exposição ao zinco é a alimentação. No caso de exposição a altas concentrações de zinco pode ocorrer desordem gastrointestinal, desenvolvimento de Alzheimer e necrose nas células pancreáticas, não havendo estudos relacionados ao desenvolvimento de câncer (ATSDR, 2005 p. 1-5; LIU, J. GOYER, R. A. WAALKES, M. P. 2008 p.959-960).

Os metais potencialmente tóxicos tornam-se essencialmente contaminantes nos ambientes pois as taxas de geração através de ciclos artificiais são maiores que através dos ciclos naturais. A transferência através das minas de extração para o ambiente também possibilita altos níveis de exposição direta aos metais (WUANA, R. A. OKIEIMEN, F. E. 2011 p. 2). A Tabela 1 resume a aplicação dos metais em várias atividades.

Tabela 1 – Utilização de metais em produtos consumíveis pela população

Uso	Metal
Baterias	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni,
Pigmentos e tintas	Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe
Ligas e soldas	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Agrotóxicos	As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn
Catalizadores	Ni, Hg, Pb, Cu, Sn
Vidro	As, Sn, Mn
Fertilizantes	Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn
Plásticos	Cd, Sn, Pb
Cosméticos	Sn, Hg
Têxtil	Cr, Fe, Al
Refinarias	Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn
Combustível	Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd

Fonte: BINEY, C. et. al., 2013.

O descarte inadequado de resíduos industriais que utilizam metais em processos contribui fortemente para o aumento da contaminação ambiental por metais potencialmente tóxicos, visto que metais não degradam-se no ambiente.

Os metais no ambiente podem ser encontrados na forma de metais totais e metais biodisponíveis. Os metais totais são aqueles que estão no ambiente como um todo. Já os biodisponíveis é uma porção dos metais totais que estão disponíveis ambientalmente devido a influências físicas, químicas e biológicas (DREXLER, J. 2003 p. 3).

Considerando que em quantidades excessivas os metais podem acarretar alterações biológicas e sabendo-se que estão presentes no ambiente faz-se necessário a determinação de quanto impactado está determinado ambiente por estes contaminantes.

2.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Levando em consideração os impactos sofridos pelo ambiente, sendo eles de origem natural ou antropogênica, as matrizes usadas para determinação de poluentes precisam de tratamento prévio para remover os interferentes, bem como liberar os analitos da amostra.

2.3 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Análises por espectrometria de absorção atômica sempre necessitam de um preparo da amostra. Esta etapa determinará o sucesso da determinação da análise, ele é responsável pela maior parte dos erros. A etapa de preparação de amostra permite a pré-concentração dos analitos tornando possível a detecção, visto que muitos analitos encontram-se em níveis traços. Percentualmente, a etapa de preparo de amostra consome 61% do tempo total da

análise completa e é responsável por 30% dos erros da análise total (BADER, N. R. ZIMMERMANN, B. 2012, p. 1733).

A técnica de espectrometria de absorção atômica necessita que a amostra esteja em solução aquosa por vários motivos como por exemplo, para introdução da amostra na fonte de excitação e para obtenção da curva analítica com padrões. Muitas matrizes como solos, tecidos de animais, plantas, derivados de petróleo e minerais não são solúveis diretamente em solventes, necessitando de um preparo preliminar (COSTA, A. C. S. et.al 2010 p. 141; HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. 2009 p. 261).

Com a finalidade do preparo de amostras para determinação de metais em matrizes complexas, são aplicados métodos de decomposição seca ou úmida. Para a decomposição úmida são utilizados ácidos oxidantes e energia como a térmica, micro-ondas e ultrassônica (NEMATİ, K. et.al 2010 p.453; MELO e SILVA, 2008 P. 556; SASTRE, J. SAHUQUILLO, A. VIDAL, M. RAURET, G. 2002 p. 59; GÜVEN, D.E. AKINCI, G. 2011 p. 29; OLIVEIRA, E. 2003 p. 154; KAZI, T.G. et.al 2009 p. 1391; BRUNORI, C. et.al. 2004 p. 101).

Para decomposição em via úmida utiliza-se ácidos minerais, pois a maioria dos metais mais eletropositivos que o hidrogênio, óxidos simples, carbonatos e sulfatos dissolvem-se em ácidos diluídos, com a formação de um sal do metal que é solúvel em água. Os ácidos mais comuns são: ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico e ácido fluorídrico. São empregados isolados ou em mistura dependendo da estrutura da amostra a ser decomposta. (COSTA, A. C. S. et.al 2010 p. 144-147; EPA, 2004 p. 12-13).

Para melhorar a eficiência da decomposição são utilizados juntamente com o ácido outros reagentes para o aumento do poder oxidante, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio. A finalidade desse procedimento é a remoção de produtos coloridos ou oxidação de materiais orgânicos no tratamento final (COSTA, A. C. S. et.al 2010 p. 155).

O procedimento que utiliza energia térmica pode ser realizado usando aquecimento via bico de Bunsen, chapa aquecedora, bloco digestor, mufla ou forno. Em comparação com métodos que utilizam outras fontes de energia, o processo utilizando bloco digestor é uma alternativa de baixo custo e apresenta resultados confiáveis. Estudos apresentam também como vantagem o baixo tempo de dissolução da amostra por via úmida (OLIVEIRA, E. 2003 p. 175-176; SAFAROVA, V.I. et.al. 2011 p. 1516).

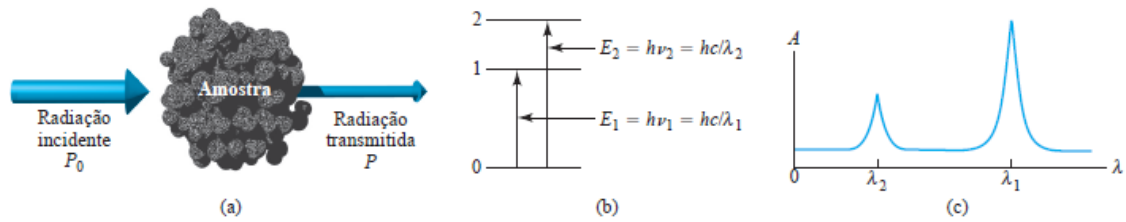
2.4 ANÁLISE DA AMOSTRA

Espectrometria de absorção atômica é empregada na determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos, em amostras, tais como soluções aquosas, metais e ligas, vidro, fármacos, alimentos, amostras ambientais, resíduos industriais, amostras biológicas, entre outros (SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p. 796; IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2011 p. 13).

A técnica de espectrometria de absorção detecta e quantifica um elemento em uma amostra de acordo com a quantidade de radiação que o analito absorve após a amostra em solução ser decomposta na chama formando átomos e íons, esta etapa é chamada de atomização.

Por conseguinte, pela diferença entre o comprimento de onda emitido (P) pela amostra e o comprimento de onda que passa pela amostra (P_0), o detector produz um sinal elétrico quando é atingido pelos fótons, ou seja, a resposta do detector é uma função do comprimento de onda da luz incidente (GARCÍA, R. BÁEZ, A. P. 2011 p.1-9; IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2011 p.13-24; SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p.796-797, 806-808; HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. 2009 p.244-247; HARRIS, C.D. 2010 p. 479-483), como demonstra a Figura 1.

Figura 1 - Processo de absorção da radiação eletromagnética



Fonte: SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p. 676.

Cada elemento possui um comprimento de onda característico, isso faz com que seja possível determinar quantitativamente a amostra, pois a concentração é calculada baseada na Lei de Beer-Lambert, onde a absorbância é diretamente proporcional a concentração como demonstrado pela equação:

$$A = \log (P_0/P) = \epsilon bc$$

Onde A é a absorbância, ϵ = absortividade molar, b = caminho ótico, c = concentração.

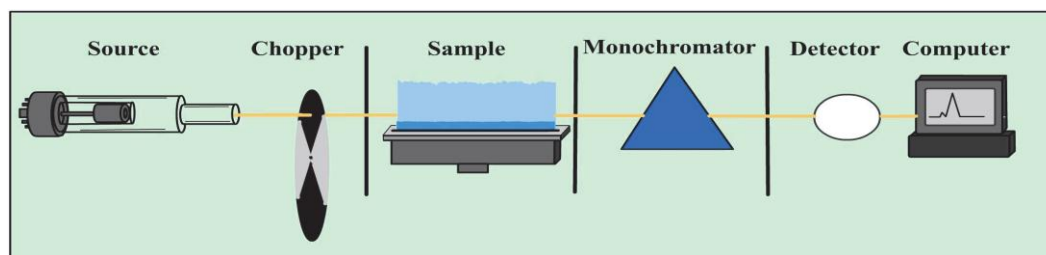
A concentração é geralmente determinada a partir de uma curva de calibração de solução de padrões com concentrações conhecidas. Um espectrofotômetro é basicamente dividido em:

- Atomizador de chama: contém um nebulizador, o qual converte a solução da amostra em uma névoa ou aerossol, que é, então, introduzido em um queimador.
- Modulador: diferencia a radiação emitida pela lâmpada, da radiação proveniente do ambiente e, principalmente, a partir do sistema de atomização.
- Fonte de luz: lâmpada utilizada para fornecer radiação em determinado comprimento de onda.
- Monocromador: parte muito importante do processo, pois é ele que separa as milhares de linhas espectrais geradas pela amostra selecionando apenas a linha do analito de interesse.

- Detector: A linha selecionada pelo monocromador é direcionada ao detector, geralmente um tubo fotomultiplicador converte a luz em sinal elétrico proporcional a intensidade da luz (GARCÍA, R. BÁEZ, A. P. 2012 p.1-9; IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2012 p.13-24; SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p.796-797, 806-808; HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. 2009 p.244-247; HARRIS, C.D. 2010 p. 479-483).

A Figura 2 apresenta esquematicamente os componentes básicos de um espectrômetro de absorção de chama.

Figura 2 - Principais componentes de um espectrômetro de absorção atômica



Fonte: IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2012 p.16

Em um espectrômetro de absorção atômica de chama, é utilizado uma mistura de gases, obedecendo a relação combustível/oxidante. A temperatura da chama determinará o sucesso da atomização, considerada como etapa limitante da precisão do método, pois trata-se do estágio de conversão do analito em átomos livres ou íons, contudo a temperatura da chama dependerá da combinação de gases utilizada (GARCÍA, R. BÁEZ, A. P. 2012 p.1-9; IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2012 p.13-24; SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p.796-797, 806-808; HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. 2009 p.244-247; HARRIS, C.D. 2010 p. 479-483).

A Tabela 2 exibe as faixas de temperatura para os gases mais utilizados em espectrometria de absorção.

Tabela 2 - Chamas utilizadas em Espectroscopia Atômica

Combustível / Oxidante	Temperatura °C
*Gás/Ar	1.700–1.900
*Gás/O ₂	2.700–2.800
H ₂ /ar	2.000–2.100
H ₂ /O ₂	2.500–2.700
**C ₂ H ₂ /ar	2.100–2.400
**C ₂ H ₂ /O ₂	3.050–3.150
**C ₂ H ₂ /N ₂ O	2.600–2.800

*Propano ou gás natural / **Acetileno

Fonte: SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p. 807.

As temperaturas entre 1.700 a 2.400°C são utilizadas para espécies como metais alcalinos e alcalinos terrosos que são facilmente excitados para níveis de energia mais elevados. Para os metais potencialmente tóxicos que necessitam de mais energia para serem excitados o oxigênio ou o óxido nitroso devem ser empregados como oxidante já que fornecem temperaturas mais altas (SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. 2006 p. 807). A espectrometria de absorção em chama, é um método muito utilizado para determinação de elementos individuais em amostras analíticas ambientais, usada pela maioria dos laboratórios de pesquisa e indústrias no controle de qualidade por todo o mundo (HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. 2009 p. 244; IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. 2012 p. 13).

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos utilizando a técnica de absorção atômica para determinação de metais em amostras ambientais.

Tabela 3 – Utilização de Espectrometria de absorção atômica para determinação de metais potencialmente tóxicos

Referência	Amostra	Método determinação	Local
Santana e Barroncas (2007)	Água e sedimento de aterro sanitário	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Liberção do chorume no sistema hídrico da bacia do Tarumã-Açu.
Birungi, et.al (2007)	Peixe e água (Tilápia)	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Pantanal Nakivubo em Uganda, que alimenta o Lago Victoria na baía Murchison
Duarte et al. (2011)	Mexilhões e sedimento	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Canal de Beagle Tierra del Fuego, Argentina
Bakirdere, S. et.al (2013)	Água de torneira e de garrafa	Espectrometria de absorção atômica forno de grafite	Parte oeste da Turquia
Squadrone, S. et. al. (2013)	Peixe catfish (músculo, fígado, rim e Guelra)	Espectrometria de absorção atômica forno de grafite	Área do rio Pó (norte da Itália)
Barone, G. Giacomini-Stuffler, R. Storelli, M.M. (2013)	Peixe (fígado)	Espectrometria de absorção atômica forno de grafite e ar/acetileno	Mar Mediterrâneo
Brito, E. M. S. et. al. (2015)	Sedimento	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Bacia do Rio Lerma e Salamanca, Mexico
Bastami, K. D. et. al. (2015)	Sedimento e peixe (músculo)	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Parte norte do Golfo Pérsico
Jitar, O. et.al. (2015)	Água, sedimento e peixe	Espectrometria de absorção atômica forno de grafite	Mar negro – costa romena
Aprile, F.M. Bouvy, N. (2008)	Sedimento	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Rio Tapacurá, Zona da Mata – Pernambuco, Brasil
Paula Filho, F. J. et.al (2015)	Sedimento	Espectrometria de absorção atômica ar/acetileno	Rio Parnaíba – Piauí, Brasil

Fonte: Autoria própria.

2.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SEDIMENTO E ÁGUA

Na avaliação da contaminação dos peixes, a determinação de metais em água e sedimento é crucial, visto que o peixe está em contato direto com estes componentes do ambiente.

Bastami, K. D. et. al. (2015) investigaram as concentrações de Cu, Zn, Pb e Cd em sedimentos da parte norte de Ormuz Estreito no Golfo Pérsico. Determinadas por espectrometria de absorção atômica, encontraram a relação de concentração onde $Cd < Pb < Cu < Zn$ e a faixa de concentração de 3,58 a 73,75 mgKg⁻¹.

Amin, B. et.al. (2009) determinaram as concentrações de Cd, Cu, Pb, Zn, Ni e Fe em sedimentos da costa de Dumai. Onde as concentrações foram determinadas por espectrômetro de absorção atômica, as concentrações foram maiores para Zn > Pb > Ni > Cu > Fe > Cd. Concluiu-se que a contaminação dos sedimentos eram derivados de empreendimentos industriais e urbanos.

Belluta, I. et.al. (2008), estudaram o impacto dos metais dissolvidos e em sedimentos no Córrego do Cintra, localizado na cidade de Botucatu-SP. Determinadas por espectrômetro de absorção atômica, encontraram-se para a amostras de água uma faixa de concentração onde os metais com maior concentração em água são Fe > Ni > Zn > Cu > Pb > Cd. Para os sedimentos a concentração dos metais seguiu outra tendência onde as maiores concentrações ficaram para Fe > Pb > Ni > Cu > Cd > Zn. Região agrícola com uso indiscriminado de agroquímicos e escoamento de águas superficiais da rodovia, justificam as altas concentrações dos metais encontrados.

Boaventura, S. F. Hadlich, G. M. Celino, J.J. (2011) identificaram graus de contaminação por metais (Cu, Zn, Cr, Ni e Mn) nos ambientes encosta, manguezal e apicum, em Madre de Deus - Bahia. Determinadas por espectrômetro de absorção atômica, encontraram-se maiores valores de concentração para Mn > Zn > Cu > Cr. Não foi encontrada contaminação por Ni. Os valores das concentrações podem decorrer da presença local de atividades industriais e portuárias e fábrica de asfalto.

Loureiro, D. et.al. (2012) estudaram a variação temporal das concentrações de metais tóxicos (Zn, Pb, Cu, Cd) registrado nos sedimentos de uma lagoa costeira hipertrófica situada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro. As amostras foram determinadas por espectrômetro de absorção atômica e as concentrações seguem a tendência de concentração Zn > Cr > Cu > Pb. A Lagoa apresenta-se poluída por Pb, Cu, Zn e Ni quando comparados com os valores padronizados pelos Estados Unidos e Canadá.

Alves, R. I. S. et.al. (2010) avaliaram as concentrações de metais (Cd, Cr, Cr, Mn, Pb e Zn) em água superficial e sedimento do córrego Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP. Determinadas por espectrômetro de absorção atômica, as concentrações encontradas para água foram observadas em tendência de Mn> Zn > Pb> Cu>Cr>Cd numa faixa de 3.10^{-5} a $0,08 \text{ mgL}^{-1}$. Para sedimento a tendência observada para as concentrações foi Mn> Zn > Cu>Pb> Cr>Cd e a faixa de concentração foi de 0,303 a $1.763,9 \text{ mgKg}^{-1}$.

Olowu, R.A. et.al. (2010) determinaram a concentração de metais (Zn, Ni e Fe) em água e sedimento na lagoa de EPE e Badagry – Nigeria. A concentração encontrada por espectrometria de absorção atômica para sedimento nas lagoas foram respectivamente de 1,95 – $2,48 \text{ mgKg}^{-1}$ para Zn, Ni 3,20-2,30 mgKg^{-1} e Fe 11,25 - $13,30 \text{ mgKg}^{-1}$. Para amostras de água encontraram para as lagoas respectivamente Zn $0,42 - 0,54 \text{ mgL}^{-1}$, Ni $0,10 - 0,6 \text{ mgL}^{-1}$, Fe $7,30 - 6,65 \text{ mgL}^{-1}$.

Kamala-Kannan, S. et.al. (2008) determinaram as concentrações de metais (Cr, Cd e Pb) em água e sedimento do Lago Pulicat no sudeste na Índia. As concentrações encontradas por espectrometria de absorção atômica, seguiram uma tendência de Cd > Cr > Pb para sedimento e Cr > Pb > Cd para água.

2.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS SEDIMENTOS

2.6.1 Índice por poluição de metais (IPM)

O IPM é utilizado para classificar o sedimento de um local como poluído e não poluído, e também para comparar locais diferentes em índices de contaminação por metal (SARALA THAMBAVANI, D. UMA MAGESWARI T.S.R 2013, p. 124; HOWARD, I. C. OLULU, B. A. 2012, p. 208; MARENGONI, N. G. et.al. 2014 p. 1159).

2.6.2 Nível de efeito Limiar (NEL) e Nível de efeito provável (NEP)

Determinar a qualidade dos sedimentos de reservatórios é importante, pois os sedimentos têm influência sobre a saúde de organismos aquáticos, que podem ser expostos a contaminantes através de interações imediatas com os sedimentos. Guias de qualidade para avaliação toxicológica de sedimentos associados a contaminantes é uma importante parte para estudo de contaminação e os efeitos adversos causados na biota.

Guias de qualidade de sedimentos, são valores de concentrações que tem por finalidade alertar o risco de todas as espécies em contato com o sedimento.

Níveis de NEL indicam que se a concentração do metal no sedimento é maior que o índice, a incidência ou a severidade dos efeitos biológicos adversos aumenta com o aumento da concentração do metal neste compartimento.

Os níveis de NEP indicam que as concentrações acima desse valor correspondem a efeitos tóxicos frequentemente observados.

Tais parâmetros foram baseados na resposta tóxica observada de determinado contaminante, considerou-se a concentração media em locais em que os efeitos biológicos significativos foram observados for maior em um fator de 2 ou mais em relação ao local em que nenhum efeito biológico adverso foi observado. Em resumo, se a concentração encontrada para a amostra de sedimento for menor que o valor de NEL raramente apresenta perigo a biota, se estiver entre os valores de NEL e NEP possivelmente a concentração dos metais está afetando a biota, no entanto se a concentração do metal dor maior que PEL, as concentrações do contaminante representa significante e imediato perigo a biota (CCME, 1995).

2.7 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM *Oreochromis niloticus*

Oreochromis niloticus é uma espécie exótica de origem africana, trazida para o Brasil em meados de 1954 e para o estado do Paraná por volta de 1982, apresenta como características a resistência às doenças, tolerância à baixa concentração de oxigênio e a temperaturas entre 8 e 42°C e também aos altos níveis de amônia e nitrito.

Propaga-se facilmente em águas paradas, possui rápido desenvolvimento acerca dos 6 meses de idade e em seguida a cada seis semanas. É uma espécie onívora, mas também alimenta-se de plâncton, alevinos, detritos e matéria orgânica em decomposição, geralmente permanecem no fundo entre a areia ou argila a procura de alimento (POPMA, T. MASSER, M. 1999; HEIN, G. BRIANESE, R. H. 2004 p. 10; FAO, 2015).

Birungi, Z. et.al. (2007) realizaram um biomonitoramento no pantanal Nakivubo em Uganda usando a tilápia como bioindicador e espectrometria de absorção atômica para determinar metais potencialmente tóxicos como Zn, Cu, Cr e Mn. Encontraram-se concentrações de 0,32 a 0,87 ug.mg⁻¹ no fígado e 0,16 a 0,57 ug.mg⁻¹ no músculo. Concluiu-se que *Oreochromis niloticus* é um bom bioindicador pela resistência em condições adversas de biomonitoramento.

Nakayama, S. M. M. et. al. (2010) determinaram a acumulação dos metais potencialmente tóxicos Cr, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, e Ni em tilápia no lago Itezhi-tezhi e lago Kariba, Zâmbia. Os metais foram quantificados por espectrometria de absorção atômica em uma faixa de 0 a 1345 mgKg⁻¹ para o fígado e 0,12 a 3 mgKg⁻¹ para o músculo. Altas concentrações de Cu foram justificadas pelo lago encontrar-se próximo a uma área de mineração. O Pb pela utilização de composto de gasolina e Ni e Cr em tintas anti-incrustante.

Eneji, I. S. Sha'Ato, R. Annune, P.A. (2011) determinaram a bioacumulação de metais potencialmente tóxicos como Cr, Zn, Cu, Fe, Mn, Cd e Pb em órgãos de tilápia do rio

Bebue no norte central da Nigéria por espectrometria de absorção atômica. As concentrações determinadas foram de 0,306 a 29,8 mgKg⁻¹. Os altos níveis de bioacumulação de Zn e Cr indicaram a tilápia como bom bioindicador para monitoramento de poluição.

Tajiri, A. N. et.al. (2011) determinaram 135 amostras de filés de tilápia, entre julho de 2006 e maio de 2007, de três frigoríficos de peixe localizados nas regiões oeste e norte do Estado do Paraná. As amostras foram analisadas, utilizando-se a espectrofotometria de absorção atômica, para averiguar a presença dos metais chumbo, cádmio e cobre. O chumbo não foi detectado nas análises. O cádmio foi detectado em três amostras, uma de cada frigorífico, nas concentrações de 0,012 mgKg⁻¹, 0,011 mgKg⁻¹ e 0,014 mgKg⁻¹. O cobre foi detectado em todos os filés, sendo as médias de concentração de cada frigorífico de 0,122 mgKg⁻¹, 0,106 mgKg⁻¹ e 0,153 mgKg⁻¹. As concentrações dos metais encontradas estão de acordo como o permitido para consumo pelas legislações europeias e australianas.

Sani, U. (2011) determinou chumbo, cobalto e cobre nos ossos, musculo e brânquias de tilápia por espectrometria de absorção atômica, do reservatório Tiga em Kano na Nigéria. Onde para o músculo foi quantificado em uma faixa de 0,11 a 14,8 mgL⁻¹. As concentrações foram maiores que o valor aceitável para consumo humano designado por FAO, 1983. A acumulação de metais pesados nas vísceras de peixe e de outros órgãos pode ser considerado como um sinal de alerta importante para a saúde dos peixes e consumo humano.

Marengoni, N. G. et. al. (2014) monitoraram a bioacumulação de Cd, Pb e Cr na tilápia do Nilo de viveiros de cultivo com administração de probióticos na ração, no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Encontraram uma faixa de concentração de 0,6 a 3,6 mgKg⁻¹ no fígado para Cd e Pb e no músculo de 9 a 10,5 mgKg⁻¹ para Pb por espectrometria de absorção atômica. A adição de probióticos na ração não influenciou a bioacumulação de Cd, Pb e Cr

nas brânquias, fígado, músculo, pele e carcaça dos juvenis de tilápia do Nilo, bem como na retenção destes metais no solo e no sedimento da caixa de coleta dos viveiros.

Como os metais possuem a tendência de acumulação nos organismos, tal fato pode acarretar grande toxicidade visto que os metais tóxicos podem competir em processos biológicos com os metais que são essenciais.

2.7.1 Bioacumulação

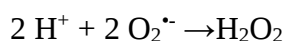
A bioacumulação é definida como acumulação de metais em tecidos de organismos por várias rotas como através da respiração, ingestão ou contato direto com água e sedimento contaminado. É o processo onde os metais tornam-se mais concentrados ao entrar na cadeia alimentar, pois são contaminantes não metabolizados pelo organismo, logo acumulam-se cada vez mais com o aumento do nível trófico. (VOULTAS, E. MAGOULAS, K., TASSIOS D., 2002 p. 645; EPA, 2000 p. 5; ABELKOP, A. D. K., 2013 p. 19; ROBINSON, L e THORN, I. 2005 p. 68-69).

2.8 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR METAIS

Em organismos considerados saudáveis, há um equilíbrio celular entre as espécies reativas e as espécies antioxidantes. As espécies antioxidantes controlam o nível de espécies reativas, contudo o estresse oxidativo está relacionado com o desequilíbrio na produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, favorecendo a quantidade de espécies reativas, levando a potenciais danos, como oxidação de proteínas e lipídeos, alteração genética, mudança no estado redox celular (HALLIWELL, B. 2007 p. 1147; LIVINGSTONE, D. R. 2003).

Oxigênio molecular é requerido por animais para oxidação de alimentos e geração de energia. Durante esse processo, oxigênio sofre redução tetravalente à água. Contudo a redução parcial do oxigênio resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo ambas espécies como radical ânion superóxido e radical hidroxila e espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio. As espécies reativas de oxigênio (EROS) são continuamente produzidas como subprodutos tóxicos indesejáveis do metabolismo normal.

A reatividade e propriedades de diferentes EROS variam consideravelmente, sendo o mais potente $\text{OH}^\cdot$. Assim, $\text{O}_2^\cdot$ pode ser convertido para H_2O_2 via dismutação:



$\text{O}_2^\cdot$ e H_2O_2 podem reagir em conjunto, para se obter $\text{OH}^\cdot$ via reação Haber-Weiss catalisada por metal: $\text{O}_2^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$

Essas EROS por sua vez pode dar origem a outras EROS como radicais peróxidos e alcóxidos ($\text{ROO}^\cdot$ e $\text{RO}^\cdot$) (LIVINGSTONE, D.R. 2001).

Existem mecanismos de defesa em muitos animais, incluindo peixes, que trabalham para neutralizar o impacto das espécies oxidativas. São sistemas que incluem enzimas antioxidantes encontradas no fígado e que desempenha um papel importante no metabolismo de substâncias tóxicas.

Glutathione (GSH) é a primeira linha de defesa antioxidante, possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos. O consumo excessivo de GSH indica um desequilíbrio redox, o que facilita o desenvolvimento de toxicidade causado pelos xenobióticos através da alteração de macromoléculas celulares. A GSH possui grupo sulfidrilas, altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Tal situação é interpretada como resposta celular a presença de alguns metais. A GSH ao se complexar com espécies reativas produz compostos que são geralmente

menos reativos e mais solúveis, isso facilitando a excreção dos mesmos. (BOELSTERLI, A. 2003 p. 123-124; ERCAL, N. GURER-ORHAN, H. AYKIN-BURNS, N. 2001 p. 529).

A Glutathione S-Transferase (GST) é um grupo de enzimas que apresenta elevada especificidade pela glutathione reduzida (GSH). A GST funciona como um catalizador para a conjugação do metal na GSH, para posterior excreção (TORRES, M. C. L. SOARES, N. F.F. MAIA, J.F. 2004, p. 243).

As Metalotioneínas (MT) são proteínas de baixo peso molecular, resistentes ao calor e não possuem aminoácidos aromáticos, sua principal característica é que 30 % dos resíduos de aminoácidos de MT são cisteínas, proteína com grande número de grupos sulfidrilas, que pode ser coordenado por íons de metais tóxicos. Uma molécula de MT pode se ligar a sete átomos de Cd, por exemplo.

Regulam os níveis intracelular de metais essenciais para o metabolismo, e protegem o organismo dos efeitos tóxicos de alguns metais não essenciais bem como do excesso de metais essenciais. Tanto os metais essenciais como os não essenciais estimulam a síntese da metalotioneína (BAYKAN, U. ATLI, G. CANLI, M. 2007 p. 33; BOELSTERLI, A. 2003 p. 133).

A lipoperoxidação (LPO) é uma consequência importante gerada pelo estresse oxidativo. Se há o favorecimento da geração de espécies reativas de oxigênio em compartimentos hidrofóbicos da célula, os lipídeos poderão ser oxidados. Assim, membranas celulares podem ter sua estrutura danificada, falência dos mecanismos de troca de metabólitos com o meio e, em uma condição extrema a morte celular.

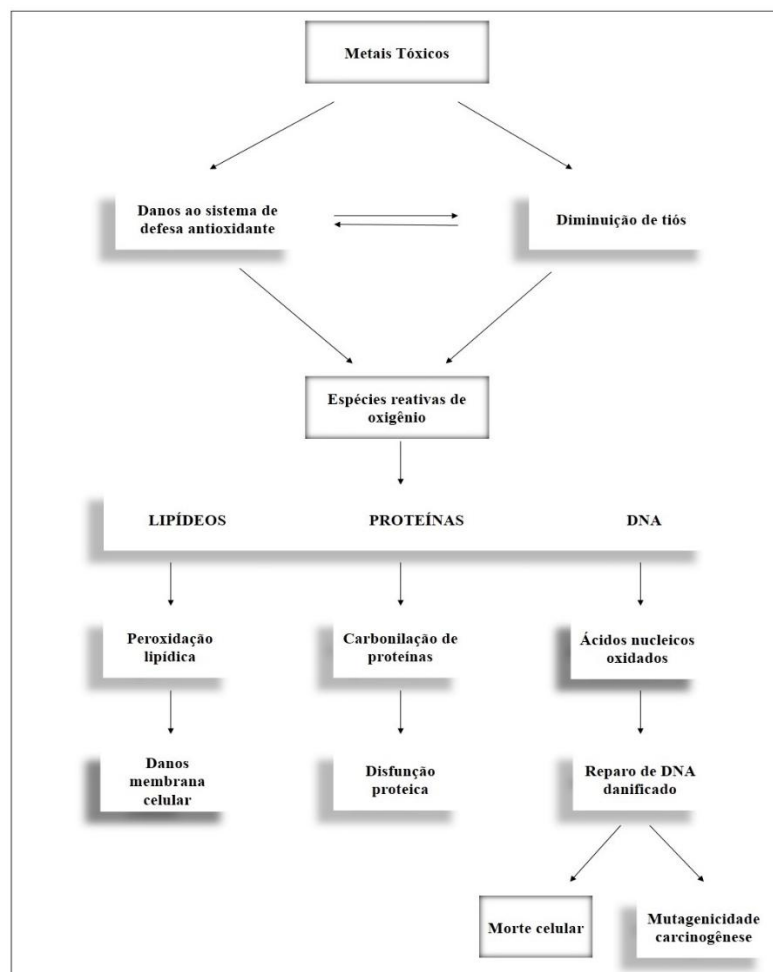
Tais alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. A LPO pode acontecer

através da peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, metais de transição e outros (BOELSTERLI, A. 2003 p. 119; LIMA, E.S. ABDALLA, D. S. P. 2001 p. 294).

A carbonilação de proteínas é uma consequência do estresse oxidativo. Esse processo de carbonilação provoca uma modificação irreversível das cadeias laterais dos aminoácidos em grupos aldeído ou cetona, podendo levar as proteínas a uma agregação, degradação ou inativação (DAILIANIS, S. PATETSINI, E. KALOYIANNI, M. 2009 p. 3613).

A Figura 3 demonstra a relação biológica com a contaminação ambiental por metais tóxicos.

Figura 3 – Contaminação por metais e a relação biológica



Fonte: Traduzido de ERCAL, N. GURER-ORHAN, H. AYKIN-BURNS, N. 2001 p. 530

Almroth, B. C. et. al. (2008), analisaram a carbonilação de proteínas e as defesas antioxidantes de peixes de ambientes contaminados com metais tóxicos. Onde uma elevada carbonilação de proteínas comparado com os peixes controle foi observada. Estudos confirmaram que a carbonilação de proteínas é um bom indicador de estresse oxidativo induzido por metais.

Farombi, E. O. Adelowo, O. A. Ajimoko, Y. R. (2007), utilizaram rim, fígado e coração de Cat fish como biomarcadores de estresse oxidativo e níveis de metais no rio Ogun – Nigeria. Os resultados demonstraram alteração nas enzimas antioxidantes, sistema glutathione e indução de peroxidação lipídica, concluindo que a presença de metais tóxicos está causando estresse oxidativo nesses peixes.

Lopes, A. P. et. al. (2001) estudaram a resposta de enzimas antioxidantes em peixes expostos a metais tóxicos em fígados de peixes de água doce. Foi notada alta atividade de GST nos peixes provenientes de áreas contaminadas por metais.

Hermenean, A. et.al. (2015), investigaram o estresse oxidativo e alterações histopatológicas induzidas por metais tóxicos em peixe na Romênia. Concluíram que o aumento das atividades antioxidantes e as lesões não foram reduzidas pelo sistema de defesa celular.

Kumari, K. Khare, A. Dange, S. (2014), aplicaram vários biomarcadores para avaliar o estresse oxidativo induzido pela toxicidade do cromo em peixes. Identificaram que a bioacumulação do Cr foi maior no fígado seguido das brânquias, musculo e cérebro, tendo um aumento significativo de trabalho do sistema defensivo celular.

Destaca-se a importância de avaliações biológicas em relação a contaminantes ambientais para um melhor diagnóstico dos efeitos, em especial os metais tóxicos, em bioindicadores expostos naturalmente.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Determinar e quantificar metais potencialmente tóxicos, Cr, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em *Oreochromis niloticus*, sedimento e água provenientes de um lago da cidade de Ponta Grossa – PR, e relacionar com danos biológicos através do estresse oxidativo em fígado.

3.2 ESPECÍFICOS

Quantificar os metais potencialmente tóxicos (Cr, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn), na água do reservatório.

Quantificar os metais potencialmente tóxicos (Cr, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn), no sedimento do reservatório, bem como avaliar a poluição por metais aplicando o índice de poluição por metais (IPM).

Quantificar os metais potencialmente tóxicos (Cr, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn), em músculo e fígado de *Oreochromis niloticus*.

Avaliar o efeito dos metais em *Oreochromis niloticus* por do estudo de estresse oxidativo celular no fígado.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - ÁREA DE ESTUDO

O lago utilizado neste estudo está localizado na cidade de Ponta Grossa, município do estado do Paraná, na região sul do Brasil (latitude 25°05'42" S e longitude 50°09'43" O). O lago está inserido em uma região impactada por atividades agrícola, urbana e industrial.

Trata-se de um lago artificial, pertencente a um clube de recreação e lazer, criado em meados de 1970, acompanhou todo o processo de desenvolvimento industrial da região. Hoje, em seu entorno há indústrias de fertilizantes, processamento de soja, posto de combustível e rodovias que dão acesso as cidades de Curitiba e Palmeira. Além dessas características atividades de pesca para consumo humano é realizada neste local.

A Figura 4 apresenta a localização da área de estudo.

Figura 4 - Mapa da região e lagoa da coleta



Fonte: Adaptação Google Maps e Memorial descritivo Clube Ponta-Lagoa.

4.2 AMOSTRAGEM

Para a coleta de todas as amostras seguiu-se as instruções do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da CETESB (2011) e Diretrizes para prática de eutanásia do CONCEA (2013).

4.2.1 Materiais

Para descontaminação dos materiais utilizados (vidrarias, frascos de coleta e materiais em geral) foi realizada em banho ácido de solução de HNO_3 (Biotec 65% de pureza) 10% v/v, por 48h. Por conseguinte, os materiais foram lavados com água deionizada e secos em estufa a 70°C, exceto balões e pipetas.

4.2.2 Bioindicador

As amostras de peixe foram coletadas no lago do Clube Ponta-Lagoa com anzol, utilizou-se 11 exemplares de *Oreochromis niloticus* sendo 5 fêmeas e 6 machos, pesando em média 600g.

Os espécimes (Figura 5) foram sacrificados utilizando-se anestésico MS-222 a 0,2%, seguida de punção espinal e posterior excisão do fígado e músculo (Figura 6) para análises químicas e biológicas.

Para análises químicas as amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno anteriormente descontaminados e mantidas em freezer a -20°C até a liofilização. Para as análises biológicas foram preservadas em nitrogênio líquido e depois em freezer -80°C até análise.

Os animais do grupo controle foram obtidos no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os animais foram criados no próprio local e foram mantidos dentro de tanques redes durante 15 dias e não sofreram nenhum manejo após o confinamento, sendo alimentados 2 vezes ao dia. O tempo de confinamento deveu-se a um outro experimento que correu em paralelo. Após esse período, os animais foram anestesiados com Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222) e mortos por secção medular. Os órgãos foram então coletados e mantidos em freezer -80°C.

Figura 5 - *Oreochromis niloticus*



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Amostragem do fígado e músculo da Tilápia

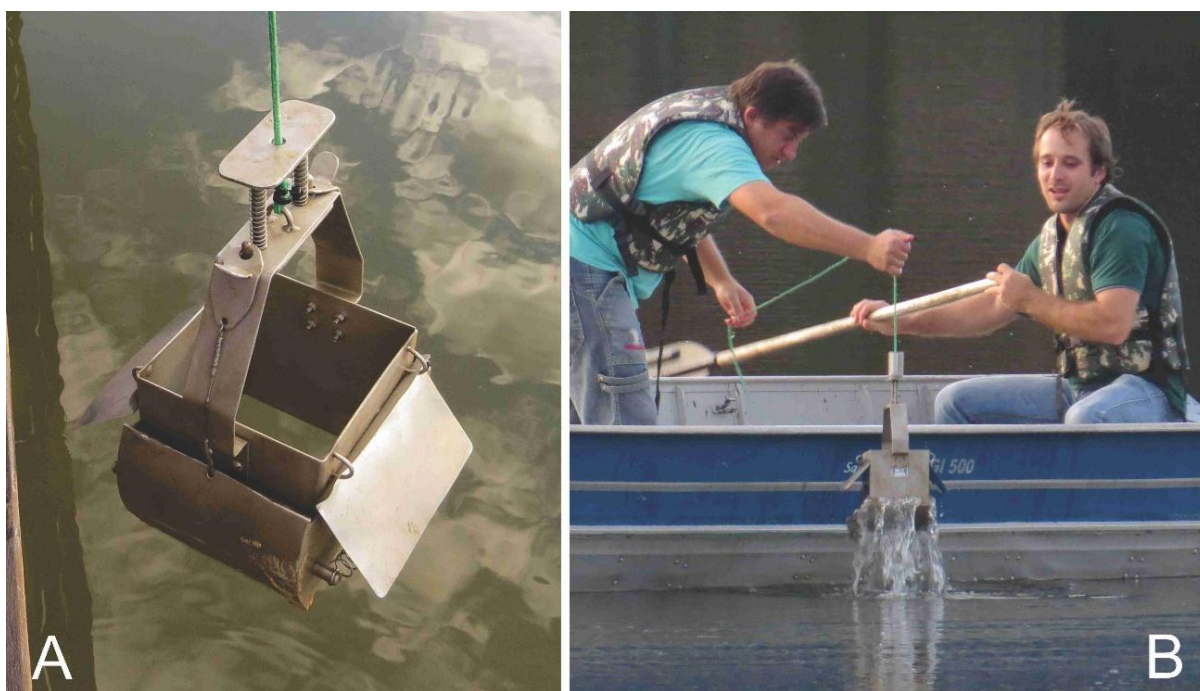


Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Sedimento

As amostras de sedimentos foram coletadas do meio do reservatório (Figura 7), superficialmente, utilizando-se um coletor metálico Ekman – Birge 225 cm² de área amostral em aço inox. O material coletado foi colocado em recipiente de polipropileno anteriormente descontaminado envoltos com papel alumínio e armazenados em freezer à -20°C para posterior liofilização.

Figura 7– a) Coletor de sedimento. b) Coleta de amostra de sedimento.



Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Água

Coletou-se 1L de água superficial e adicionou-se no momento da coleta ácido nítrico para preservação da amostra para determinação de metais. A amostra foi armazenada em geladeira à 4°C até a preparação e posterior determinação.

4.3 PREPARO DE AMOSTRA

4.3.1 Água

Para determinação de metais totais as amostras de água foram tratadas de acordo com o método padrão USEPA 3005 A (1992). Para extração foi utilizado 100 mL de amostra sem material grosseiro, acrescentou-se 2 mL de HNO₃ (Biotec) e 5 mL de HCl (Biotec) ambos concentrados. Aqueceu-se em chapa aquecedora, à 95°C até a redução do volume. O material resultante foi resfriado à temperatura ambiente e avolumado a 50 mL com água ultrapura com resistividade específica de 18 MΩ cm⁻¹, obtida através de um sistema de ultra purificação de água e Osmose Reversa Gehaka[®]. O mesmo procedimento foi realizado para amostra de água que foi filtrada com papel filtro de 0,45 µm para retenção do material particulado. Realizou-se o branco das amostras com todas as etapas, no entanto sem a matriz.

4.3.2 Sedimento e Bioindicador

A massa das amostras foi obtida em balança analítica da marca OHAUS PA1140 e o processo de liofilização em Liofilizador marca Terroni LD1500A.

Para determinação de metais totais em peixe e sedimento, as amostras foram tratadas de acordo com o método padrão USEPA 3050B (1996) em duplicata autentica. Para extração utilizou-se 0,5g de amostra liofilizada, em tubos de borossilicato e adicionou-se 5 mL de HNO₃ 1:1, aqueceu-se em bloco digestor marca Tecnal TE-040/25, deixando em refluxo por 15 min sem ebulição.

Após o resfriamento da amostra, adicionou-se 2,5 mL de HNO₃ concentrado deixado em refluxo por 30 min. Repetiu-se o passo até a não liberação de fumaça marrom, então permaneceu em aquecimento por 2 horas. Após resfriamento adicionou-se 1 mL de água

Ultrapura com resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, obtida através de um sistema de ultra purificação de água e Osmose Reversa Gehaka® e 1,5 mL de H_2O_2 30% (Biotec), aqueceu-se até efervescência mínima. Aqueceu-se por mais 2 h, em seguida resfriou-se e avolumou-se para 50 mL com água ultrapura.

Para determinação de metais biodisponíveis em peixe e sedimento, utilizou-se a metodologia descrita por Cotta, Rezende e Piovani, (2006). Utilizou-se 0,5g de amostra com 12,5 mL de HCl (Biotec) 0,1 mol/L. Agitou-se a 200 rpm por 2 horas. O material obtido foi filtrado por gravidade, e em seguida avolumado para 50 mL com água ultrapura.

Para todas as extrações fez-se o teste branco com todos os procedimentos, no entanto sem a matriz.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

A determinação dos metais Cd, Cu, Ni, Zn, Cr, Pb, Mn e Co foi realizada utilizando espectrômetro de absorção atômica de chama (EAAC) da marca Varian® AA 240FS com diluidor automático, equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo e lâmpadas de catodo-oco multielementar. Utilizou-se chama oxidante ar/acetileno.

A Tabela 4 fornece os parâmetros instrumentais para as medidas por EAAC.

Tabela 4 - Parâmetros instrumentais para as medidas por EAAC

Elementos	Comprimento de Onda (nm)	Faixa Trabalho (mgL^{-1})
Cd	228,8	0,02 - 3,0
Co	240,7	0,05 - 15,0
Cr	357,9	0,06 - 15,0
Cu	324,8	0,03 - 10,0
Fe	248,3	0,06 - 15,00
Mn	279,5	0,02 - 5,0
Ni	232	0,10 - 20,0
Pb	217	0,10 - 30,0
Zn	213,9	0,01 - 2,0

Fonte: (AGILENT, 2012).

4.5 ÍNDICE DE POLUIÇÃO POR METAIS (IPM)

Para cálculo de IPM considerou-se o sedimento se, $IPM > 1$ como poluído, se $IPM < 1$ não poluído (SARALA THAMBAVANI, D. UMA MAGESWARI T.S.R (2013); HOWARD, I. C. OLULU, B. A. (2012)). O IPM foi calculado pela seguinte equação:

$$IPM = (C_1 \times C_2 \times C_n)^{1/n}$$

Onde

C_1 = Valor da concentração do primeiro metal

C_2 = Valor da concentração do segundo metal.

C_n = Valor da concentração do k metal

4.6 FATOR DE BIOACUMULAÇÃO (FBA)

Utilizou-se um modelo empírico proposto pela USEPA (2000), para calcular a acumulação de determinado contaminante em organismos que estão em contato direto ou indireto com o contaminante.

$$FBAs = Ct/Cs$$

$$FBAa = Ct/Ca$$

Onde,

Ct é a concentração do contaminante no tecido do organismo

Cs é a concentração do contaminante no sedimento

Ca é a concentração do contaminante na água

4.7 Nível de efeito limiar (NEL) e Nível de efeito provável (NEP)

Utilizou-se os índices tabelados de NEL e NEP pela CCME (1998) para comparação com os resultados obtidos. Valores de NEL e NEP possuem caráter orientador na busca de evidências da presença de contaminantes em nível capaz de provocar efeitos danosos quanto a toxicidade para a biota.

4.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.8.1 Determinação da glutathione S-transferase, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas

Para os ensaios biológicos utilizou-se as amostras de fígado. Homogeneizou-se 0,3g do fígado em Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM. Completou-se para 1,5 - 2 ml com tampão gelado. Em seguida centrifugou-se a 12.000g durante 20 min a 4°C. Separou-se as alíquotas do sobrenadante em tubos de 2 ml e foram armazenados a temperatura de -76 °C (BRADFORD, M. M. 1976; JIANG, Z. Y. HUNT, J.V. WOLFF, S.P. 1992; LEVINE, R.L. WILLIAMS, J.A. STADTMAN, E.P. SHACTER, E.1994; KEEN, H. JAKOBY, N. 1976).

Para a determinação da glutathione S-transferase, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas utilizou-se um espectrofotômetro de microplacas da marca Infinite® 200 PRO – Tecan, para ler a absorbância a 595 nm. E para determinação de metalotioneína leu-se a absorbância a 412 nm.

4.8.2 Determinação de metalotioneínas

Para determinação de metalotioneínas utilizou-se a metodologia de Viarengo, A. et.al. (1997). As amostras de fígado (0,1g) foram homogeneizadas em 0,5 ml de tampão. Centrifugou-se a 15.000 *g* por 30 min, 0-4 °C. Transferiu-se para novo tubo 300 µl do sobrenadante. Adicionou-se ao tubo 342 µl da solução de etanol absoluto e clorofórmio e refrigerou-se a -20 °C. Centrifugou-se a 6.000 *g* por 10 min a 0-4 °C.

Transferiu-se para novo tubo 490 µl do sobrenadante e adicionou-se 1502 µl da solução de etanol absoluto e HCl concentrado, refrigerou-se a -20 °C. Em seguida o material foi agitado e mantido a -20 °C por 1 h. Por conseguinte centrifugou-se a 6.000 *g* por 10 min a 0-4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido com 1000 µl da solução de etanol absoluto com clorofórmio e tampão Tris-HCl.

Agitou-se e centrifugou-se a 6.000 *g* por 10 min a 0-4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 50 µl de solução de NaCl. Adicionou-se 50 µl de solução de EDTA-sódico. Agitou-se e adicionou-se 1000 µl de solução de Ellman a cada tubo com amostras e também aos tubos da curva-padrão de GSH contendo 100 µl de GSH. Agitou-se e centrifugou-se a 3.000 *g* por 5 min.

Adicionou-se a 200 µl do sobrenadante a microplacas, inclusive da curva-padrão de GSH. Para o branco substituiu-se as amostras por 50 µl de solução de NaCl (250 mM) + 50 µl de solução de EDTA-sódico (EDTA a 4 mM + HCl a 1 M).

4.8.3 Determinação de glutatona reduzida

A concentração de glutatona reduzida foi quantificada segundo EDLAK e LINDSAY, (1968). Para isso, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 48% em 200µl de

amostra, para precipitação proteica. Após isso, foram centrifugadas e pipetados 50 μ l do sobrenadante em microplaca. Após isso, foi adicionado 230 μ l com tampão tris-base 0,4 M, pH 8,9 e 20 μ l de DTNB (ácido 5,5' -ditio-bis-2-nitrobenzóico). A incubação ocorre durante 10 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lida a 415 nm. A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH. Pesou-se 0,0012 g GSH ($MM = 307,32 \text{ g.mol}^{-1}$) e adicionou-se 976 μ l de tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ($[GSH] = 4 \text{ mM}$). A partir desta solução, preparou-se as demais concentrações: 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 μ M.

4.8.4 Quantificação de proteínas totais

Para normalização dos dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi necessária a quantificação de proteínas totais da amostra.

Durante os ensaios reservaram-se 100 μ l das amostras para quantificação de proteínas. Em microplaca, adicionou-se 10 μ l do sobrenadante das amostras seguidos de 250 μ l do reativo de Bradford (“Coomassie brilliant blue” BG-250) e procederam-se as leituras de absorbância ($\lambda = 620 \text{ nm}$; faixa de leitura = 595-620 nm). Como branco utilizou-se PBS. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o processamento dos dados e análise estatística foram utilizados os softwares ASSISTAT - 7.7, R Project for Statistical Computing e PAST – 3.04.

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk.

Para análise de variância foi utilizado o teste ANOVA com delineamento inteiramente casualizado, foi utilizado o teste Scott-Knott para testar as diferenças significativas entre as concentrações médias de metais.

A análise por agrupamento hierárquico (HCA) foi pré processado por auto escalamento e método de ligação incremental.

Considerou-se valores estatisticamente significativos para dados onde $p < 0,01$ sendo 99% de confiança, e para valores onde $p < 0,05$, com 95% de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – TESTE DE EXATIDÃO DO MÉTODO EMPREGADO

Para execução da curva analítica utilizou-se soluções estoque de concentração 1000 mgL⁻¹ de Cd, Cu, Ni, Zn, Cr, Pb, Mn e Co da marca Qhemis High Purity. A partir dessa solução preparou-se uma solução de 1mgL⁻¹, da qual obteve-se as diluições para a curva analítica, sendo os pontos 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mgL⁻¹.

Para validação do processo de digestão utilizado para abertura das amostras, digeriu-se amostras certificadas por European Reference Materials ERM-CE278 (tecido de mexilhão) do Instituto para Materiais de Referência e Medidas da Europa (Institute for Reference Materials and Measurements – IRMM), contendo os metais As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn. E (MRC) MESS-2, sedimento marinho, sendo os resultados de recuperação encontrados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações médias e recuperação dos metais encontrados nas amostras de material de referência certificado e limite de quantificação (n=2)

Amostra	Metais	Valores Certificados (mgKg ⁻¹)	Valores encontrados (mgKg ⁻¹)	Recuperação (%)	LQ (mgKg ⁻¹)
Sedimento marinho (MESS-2)	Cd	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,02	95,8	0,017
	Co	13,8 ± 1,4	14,7 ± 0,001	106	0,030
	Cr	106,0 ± 8,0	97,7 ± 3,5	92	0,033
	Cu	39,3 ± 2,0	42,0 ± 2,7	106	0,040
	Mn	365,0 ± 21,0	338,2 ± 3,2	92,6	0,014
	Ni	49,3 ± 1,8	46,0 ± 1,5	93,3	0,044
	Pb	21,9 ± 1,2	20,0 ± 1,0	91,3	0,240
Tecido de mexilhão (ERM- CE278)	Zn	172,0 ± 1,6	171,6 ± 6,5	99,9	0,092
	Cd	0,348 ± 0,007	0,3 ± 0,01	92	0,017
	Cr	0,78 ± ,06	0,7 ± 0,02	90	0,033
	Cu	9,45 ± 0,13	10,0 ± 0,15	106	0,040
	Mn	7,69 ± 0,23	7,9 ± 0,19	103	0,014
	Pb	2,00 ± 0,04	1,8 ± 0,05	91	0,240
	Zn	83,10 ± 1,7	82 ± 2,0	99	0,092

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os percentuais de recuperação aceitáveis descritos pela AOAC (2002) (75 a 120%), os resultados obtidos confirmam que o método empregado é adequado. Assim, atribui-se tal método para os outros metais que não estão presentes no MRC, mas que neste trabalho foram quantificados.

5.2 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram analisadas amostras de água previamente filtradas em membrana HA em éster celulose estéril branca lisa S-P 0,45u 47mm e amostras de água não filtradas para verificar a influência da quantidade de metais em material particulado na amostra. As concentrações determinadas para os metais em amostras de água são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de metais em amostra de água previamente filtrada e não filtrada

Metal	Água Filtrada	Água não filtrada
	(mgL ⁻¹)	(mgL ⁻¹)
Cd	<LQ	<LQ
Co	0,133 ± 0,002	0,143 ± 0,018
Cr	<LQ	<LQ
Cu	<LQ	<LQ
Mn	0,628 ± 0,007	0,674 ± 0,015
Ni	0,078 ± 0,003	0,098 ± 0,006
Pb	<LQ	<LQ
Zn	<LQ	<LQ

Fonte: Autoria própria

Dos metais encontrados na amostra de água as concentrações variaram da seguinte maneira: Mn>Co>Ni tanto para as amostras de água filtrada e não filtrada. Em estudo similar realizado em reservatório por Voigt, C. L. et.al. (2014) encontrou-se menores concentrações para estes metais como Mn (0,067±0,01), Co (0,0197±0,001) e Ni (0,0075±0,002), no entanto verificou-se que a ordem de concentração permaneceu a mesma.

Notou-se diferença em relação as concentrações da amostra filtrada quando comparada à não filtrada, que pode ser explicada pela diferença de material particulado presente na amostra, quando utilizou-se a membrana de celulose 0,45µm, para a amostra filtrada todo o material que passou por ela considera-se dissolvido, assim pela diferença nas concentrações, considera-se que os metais presentes na água estão dissolvidos, e uma pequena parcela está ligada ao material particulado.

Para os metais Cd, Cr, Cu, Pb e Zn as concentrações não puderam ser quantificadas pois ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica.

O local de estudo está localizado próximo a indústrias de fertilizantes, à margem de rodovias, o que pode justificar as quantidades elevadas de Co, Mn e Ni. Tais elementos são micronutrientes quando em pequenas quantidades utilizados em fertilizantes na forma de sulfatos, óxidos, quelatos e oxalatos solúveis em água (MAPA nº 05/2015).

5.3 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Na Tabela 7 pode-se observar os resultados obtidos na determinação dos metais totais e biodisponíveis para amostra de sedimento, bem como, os valores atribuídos para efeitos biológicos adversos em relação a concentração de cada metal pelo Conselho Canadense de Ministérios do Meio Ambiente (CCME, 1998). O Conama 344/04 apresenta a qualidade para sedimentos em Nível 1 e Nível 2 que são os valores de NEL e NEP respectivamente para Cd, Cr, Cu, Pb e Zn, para o Ni o Conama 344/04 segue o parâmetro do Departamento de proteção ambiental da Flórida (FDEP (1994)).

Tabela 7 – Concentração de metais totais e biodisponíveis em amostra de sedimento

Metais	Totais (mgKg ⁻¹)	Biodisponíveis (mgKg ⁻¹)	NEL* (mgKg ⁻¹)	NEP** (mgKg ⁻¹)	Conama 344/04 Nível 1	Nível 2
Cd	4,6 ± 0,9	<LQ	0,6	3,5	0,6	3,5
Co	24,9 ± 2,6	13,7 ± 0,2	-	-	-	-
Cr	<LQ	<LQ	37,3	90	37,3	90
Cu	141,9 ± 5,1	40,3 ± 0,3	35,7	197	35,7	197
Mn	839,4 ± 91,1	484,9 ± 81,1	-	-	-	-
Ni	46,8 ± 3,8	12,9 ± 0,2	-	-	18	35,9
Pb	53,4 ± 6,6	31,8 ± 0,3	35	91,3	35	91,3
Zn	865,5 ± 38,2	473,2 ± 38,2	123	315	123	315

*nível de efeito limiar

** nível de efeito provável

Fonte: Autoria própria

As concentrações encontradas nos sedimentos são caracterizadas por valores acima dos encontrados na água para todos os metais determinados. A presença dos metais nos sedimentos obedeceu a seguinte sequência de concentração: Zn>Mn>Cu>Pb>Ni>Co>Cd. Comparou-se os resultados com o estudo feito por Voigt, L. C. et.al. (2014), por ser tratar de um estudo semelhante realizado em reservatório da mesma região.

A concentração de Cd foi a menor dentre os metais analisados, em estudo similar em reservatório realizado por Voigt, L. C. et.al. (2014), a concentração encontrada para Cd (4,07±0,31) em um dos pontos, foi próxima a encontrada neste trabalho e Bastami, K. D. et.

al. (2015) que encontraram concentrações para Cd 4.58 ± 1.18 (mgKg⁻¹). Mas comparando-se com o CONAMA N°344/2004 e valores adotados internacionalmente pela CCME (1998) para NEL e NEP, a concentração encontrada representa perigo potencial aos organismos expostos.

Para o Co as concentrações foram de 24,9 mgKg⁻¹ próximas ao estudo feito por Voigt, L. C. et.al. (2014) que encontraram para Co ($28,00 \pm 1,07$) e Santana e Barroncas (2007) encontraram 33 mgKg⁻¹. Não há valores tabelados para classificação de concentrações em sedimento para o Co nas legislações.

As concentrações encontradas para o Ni estão acima do valor considerado seguro para biota e comparando com estudos de Voigt, L. C. et.al. (2014) as concentrações foram maiores ($27,65 \pm 2,72$) e similares ao trabalho de Jesus, H. C. et.al. (2004) que encontraram 43 mgKg⁻¹. Para legislação internacional não há valores de referência para Ni.

Pode-se observar que para o Pb as concentrações obtidas foram intermediárias em relação aos outros metais deste estudo. Sua concentração foi maior quando comparou-se com as concentrações encontradas no estudo de Voigt, C.L. et.al. (2014) que determinaram $31,96 \pm 3,20$ mgKg⁻¹. No entanto foi menor em relação aos estudos de Alves, R.I.S. et.al. (2010) que encontraram 672,7 mgKg⁻¹. Comparando com nível do CONAMA N°344/2004 e CCME (1998), a concentração de Pb representa perigo potencial aos organismos expostos.

A amostra apresentou concentrações de Cu ($141,9 \pm 5,1$ mgKg⁻¹) maiores em relação ao trabalho de Voigt, C.L. et.al. (2014) Cu ($40,32 \pm 7,44$) e Loureiro, D. et.al. (2012) Cu $42,8 \pm 7,38$ mgKg⁻¹ e menor em relação ao estudo feito por Alves, R.I.S. et.al. (2010) Cu 1.569,7 mgKg⁻¹. Em relação aos parâmetros das legislações CONAMA N°344/2004 e CCME (1998) as concentrações encontradas da mesma forma que Pb, Ni e Cd apresentam risco potencial aos organismos expostos.

Com a segunda maior concentração encontrada entre os metais analisados, o Mn teve concentrações maiores que as encontradas pelos autores Voigt, C.L. et.al. (2014) $336,39 \pm$

54,53 e menores em relação a Alves, R.I.S. et.al. (2010) e 4.879,1 mgKg⁻¹. Não há parâmetros para este metal na legislação nacional e internacional.

Para Zn encontrou-se o maior valor de concentração de todos os metais analisados, sendo maior em relação aos estudos de Voigt, C.L. et.al. (2014) que encontraram 65,93±12,82 e Loureiro, D. et.al. (2012) que determinaram 124 ± 5,11 mgKg⁻¹ e menor em relação ao encontrado por Alves, R.I.S. et.al. (2010) 1.604,9 mgKg⁻¹. CONAMA N°344/2004 e CCME (1998) indicam que o metal Zn está diretamente relacionado aos efeitos adversos biológicos.

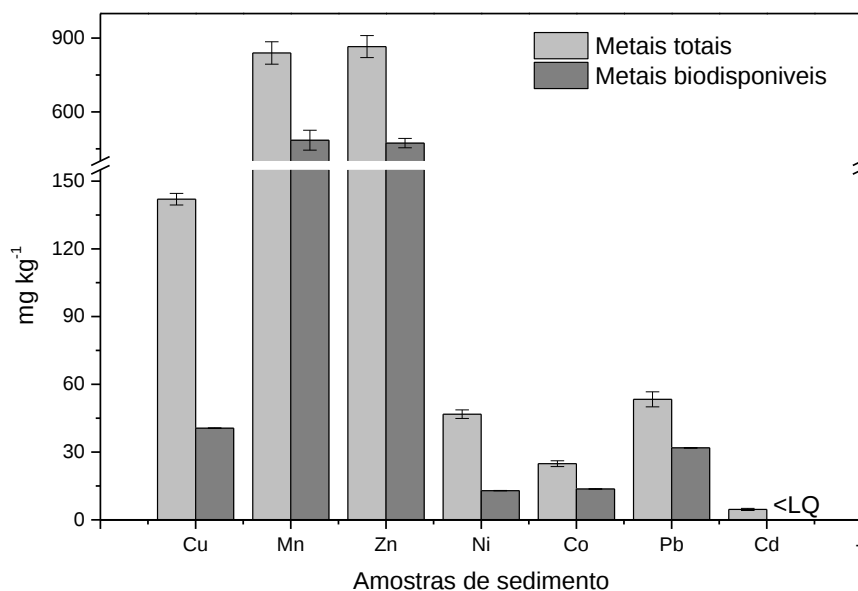
O local de estudo deste trabalho encontra-se as margens de rodovias e posto de combustível, tais fatores podem contribuir para a acumulação de metais nos sedimentos da lagoa. Automóveis são uma importante fonte de contaminação por metais em ambientes urbanos, pois os metais são liberados dos veículos por vários caminhos, por exemplo, Cd Cr Cu Ni, Pb, Zn estão presentes em combustíveis e Zn faz parte de também de lubrificantes. Em épocas chuvas o deslocamento dos metais que estão na estrada é direcionado para dentro do reservatório e solo (PULLES, T. et al. 2012 p. 641-651; PEREIRA, E. et. al. 2007 p. 744; BELLUTA, I. et.al. 2008 p. 253).

A estrutura dos reservatórios faz com que características hidráulicas do fluxo de água seja alterada, diminuindo a velocidade do fluxo faz com que as partículas sólidas depositem-se no fundo. O depósito no leito do reservatório é formado de materiais sólidos, sedimentos que são carregados por enxurradas de areia e argila dos arredores do reservatório e também por deposição da decomposição de matéria orgânica. Assim as partículas de maior diâmetro se depositam na entrada do reservatório e as mais finas no decorrer do reservatório (FERREIRA, C.W.S. 2012).

Sedimentos de reservatórios são um estoque de contaminantes, como os metais, estes por sua vez podem estar ligados à areia ou argila, ou também complexados à matéria orgânica condicionados as condições ambientais.

Para isso determinou-se as concentrações de metais biodisponíveis nas amostras de sedimento, como demonstradas na Figura 8 em relação as concentrações dos metais totais.

Figura 8– Concentração de metais totais e biodisponíveis em sedimento



Fonte: Autoria própria

A tendência para as concentrações dos metais biodisponíveis nas amostras foi Mn>Zn>Cu>Pb>Co>Ni. A tendência em relação aos metais totais para Cu e Pb foi a mesma. No entanto para Zn e Mn, Co e Ni, houve uma inversão na tendência, sendo que a concentração de Zn e Co foram maiores para metais biodisponíveis em relação as concentrações de Mn e Ni, respectivamente.

Devido às condições ambientais a biodisponibilidade desses metais pode ser alterada, como por exemplo, os metais podem ser adsorvidos em partículas de argila ou matéria orgânica, contudo eles podem ser novamente disponibilizados para o meio aquático através das reações de oxirredução, atividade dos organismos aquáticos e atividades humanas (COTTA, REZENDE E PIOVANI, 2006). Devido a tais condições as concentrações de metais biodisponíveis são menores que as concentrações dos metais totais.

A partir de todas as concentrações dos metais pode-se calcular o IPM, encontrou-se um valor de 2,89 o que indica que o sedimento do local de estudo encontra-se poluído pelos

metais estudados. Howard, I. C. Olulu, B. A. (2012), utilizaram valores de IPM para investigar a poluição por metais em várias partes do rio Sombriero, os valores encontrados para os metais (Cd, Pb, V, Fe, Ni, Cu e Zn) mostraram consistência no índice de poluição por metal das várias estações da área de estudo. As estações com maiores índices de poluição foram relacionadas às áreas de atividades industriais intensas.

5.4 CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM FÍGADO E MÚSCULO DE *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA)

A Tabela 8 apresenta as concentrações de metais potencialmente tóxicos encontradas para as amostras de músculo e fígado de *Oreochromis niloticus* e os limites aceitáveis para consumo pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para metais em peixe.

Tabela 8 – Concentração de metais em músculo e fígado de Tilápia e limites aceitáveis pela ANVISA para músculo

	Músculo (mgKg ⁻¹)	Fígado (mgKg ⁻¹)	Anvisa (mgKg ⁻¹)
Cd	<LQ	4,51 ± 0,194	0,05*
Co	10,93 ± 0,4	17,19 ± 0,53	-
Cr	<LQ	<LQ	0,1**
Cu	<LQ	<LQ	30**
Mn	<LQ	11,88 ± 0,75	-
Ni	5,4 ± 0,37	10,59 ± 0,52	5,0**
Pb	24,4 ± 1,9	24,0 ± 1,7	0,3*
Zn	33,4 ± 6,9	89,52 ± 2,59	50**

* Resolução-RDC n. 42, de 29/08/2013

** Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965

Fonte: Autoria própria

Por meio dos resultados encontrados na Tabela 8 verificou-se que a tendência de concentração dos metais no fígado foi Zn>Pb>Co>Mn>Ni>Cd. E para o músculo foi Zn>Pb>Co>Ni. Verificou-se que a tendência nas concentrações de metais em fígado e músculo, permaneceram as mesmas. No entanto as concentrações no fígado foram mais altas em relação as concentrações encontradas no músculo. As concentrações dos metais Cd, Cr, Cu e Mn (músculo) e Cr e Cu (fígado) ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica.

O fígado sintetiza e segrega um grande número de proteínas, tais como fibrinogênio e albumina. O papel metabólico importante do fígado está relacionado à sua localização privilegiada dentro da circulação sistêmica. Este local também é devido a importância do fígado no armazenamento, metabolismo, redistribuição, e excreção de tóxicos ambientais e faz com que seja ao mesmo tempo, um tecido alvo de substâncias tóxicas (HINTON, D. E. et. al 2008).

Uma rota de exposição de metais no fígado é o transporte pelo sangue, os metais podem se ligar às proteínas plasmáticas e ser transportados para o restante do organismo, como é o caso do Cd apontado no estudo realizado por Squadrone, S et.al. (2013).

Nos músculos a atividade metabólica é relativamente menor em relação ao fígado o que justifica a menor capacidade de acúmulo de metais no músculo (SQUADRONE, S. et.al. 2013).

Resultados semelhantes às concentrações encontradas para o músculo neste trabalho foram encontradas por Voigt, C. L. et.al. (2014) em reservatório onde foram determinadas concentrações de Co 7.87 ± 0.88 , Ni 3.70 ± 1.35 , Pb 1.91 ± 1.31 , Zn 23.18 ± 4.48 (mgKg^{-1}). Na Nigéria, Eneji, I. S. Sha'Ato, R. Annune, P. A. (2011) encontraram para Pb 3,58, Zn 18,1 (mgKg^{-1}). Kumar, B. et. al. (2011) na Índia, verificaram para o Ni 4.03 ± 0.55 , Zn 47.80 ± 3.29 (mgKg^{-1}).

De acordo com os valores encontrados para o músculo e os valores limites estabelecidos pela Anvisa apontados na Tabela 8, os metais Ni e Pb encontram-se acima dos valores permitidos pela legislação, o que indica risco de exposição humana devido ao consumo.

Já para o Zn a concentração encontrada está abaixo do valor máximo estabelecido pela ANVISA (50 mgKg^{-1}), porém mesmo sendo um micronutriente, em quantidades elevadas pode prejudicar o metabolismo celular. Em estudo onde Tilápias foram expostas a

quantidades baixas (1mgL^{-1}), médias ($2,5\text{ mgL}^{-1}$) e altas (5 mgL^{-1}) de Zn tiveram mudanças significativas observadas nos parâmetros imunológicos e hematológicos (ÇELIK, E. S. et.al. 2012).

O Pb pode ser absorvido pelo intestino e estocado nos ossos, uma vez que o Pb^{2+} tem um raio similar ao do Ca^{2+} da hidroxiapatita. Como o osso é continuamente formado e reabsorvido, isto permite que o Pb^{2+} circule no sangue atingindo alvos críticos nos tecidos nervosos e formadores do sangue. O chumbo no sangue mesmo em pequenas concentrações está relacionado a dificuldades de crescimento, audição e desenvolvimento mental (SHRIVER, et.al. 2008).

O Ni é necessário em pequenas quantidades para a produção de células vermelhas do sangue, mas torna-se ligeiramente tóxico em excesso de quantidade. Sua exposição crônica pode causar redução do peso corporal, do coração e no fígado, e irritação na pele (GOVIND, P. MADHURI S. 2014 p. 20).

As médias das concentrações dos metais determinadas nas amostras de fígado e músculo estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10, juntamente com seu desvio padrão.

Tabela 9 – Concentração de metais em amostras de fígado de *Oreochromis niloticus*

Amostra	Cd	Co	Ni	Pb	Zn	Mn
6	5.8±0,1a	16.8±0,9a	10.7±0,17a	25.8±4,3a	91.0±1,7b	20.2±0,2b
7	5.3±0,02a	18.5±0,4a	11.3±1,8a	28.7±0,01a	82.2±1,0b	7.2±0,7e
8	5.6±0,6a	16.4±0,8a	10.5±0,8a	22.2±3,8b	90.5±4,8b	22.5±1,2b
9	4.8±0,01a	16.1±0,7a	9.6±2,4a	31.4±8,6a	119±11a	31.1±2,1a
10	5.3±0,1a	19.4±0,2a	12.3±0,07a	24.9±1,8b	88.5±3,9b	9.1±0,4e
12	3.9±0,3b	12.5±0,1b	9.9±0,8a	21.0±1,4b	84.6±2,3b	4.0±0,2f
13	3.5±0,2b	16.9±0,03a	7.3±0,6a	16.5±0,1b	94.5±14b	13.4±3,4c
14	3.4±0,04b	18.9±0,3a	10.3±0,5a	18.9±0,7b	83.0±2,9b	5.8±0,4f
15	3.7±0,9b	17.5±1,6a	9.5±1,8a	22.2±4,4b	84.7±1,7b	14.4±0,8c
16	5.9±0,2a	17.5±0,3a	12.1±0,3a	31.8±1,7a	121±0,6a	10.4±1,5d
17	4.2±1,2b	12.6±2,4b	11.2±0,2a	30.0±0,2a	119±6,9a	5.2±1,2f

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, considerando o valor nominal de 5% de significância.

Fonte: Autoria própria

Os resultados permitem concluir que houve diferença significativa entre as amostras de fígado analisadas com relação às concentrações de metais determinadas ao nível de 5%.

Tabela 10 – Concentrações de metais nas amostras de músculo analisadas

Metal	Co	Ni	Pb	Zn
6	8.0±0,1c	5.2±0,2a	21.6±0,3a	53.1±22,7a
7	8.2±0,5c	6.5±0,6a	22.2±2a	29.9±1,0a
8	8.7±1,5c	5.1±0,1a	21.5±3a	33.1±1,2a
9	11.7±1,1b	5.3±0,1a	24.4±1,4a	45.9±7,4a
10	13.4±0,4a	5.9±0,1a	25±0,1a	33.4±5,6a
12	12.7±0,4a	6.3±0,2a	24.5±5,2a	36.0±8,4a
13	11.5±0,1b	6.1±2,0a	26.9±2,3a	33.9±6,3a
14	10.9±0,3b	4.7±0,9a	24.4±1,1a	27.4±6,0a
15	11.4±0,5b	5.5±0,4a	26.3±3,7a	20.7±1,3a
16	10.8±0,2b	5.2±0,01a	29.3±2,4a	27.3±7,0a
17	10.5±0,2b	5.7±1,3a	28.4±0,3a	51.9±16a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, considerando o valor nominal de 5% de significância.

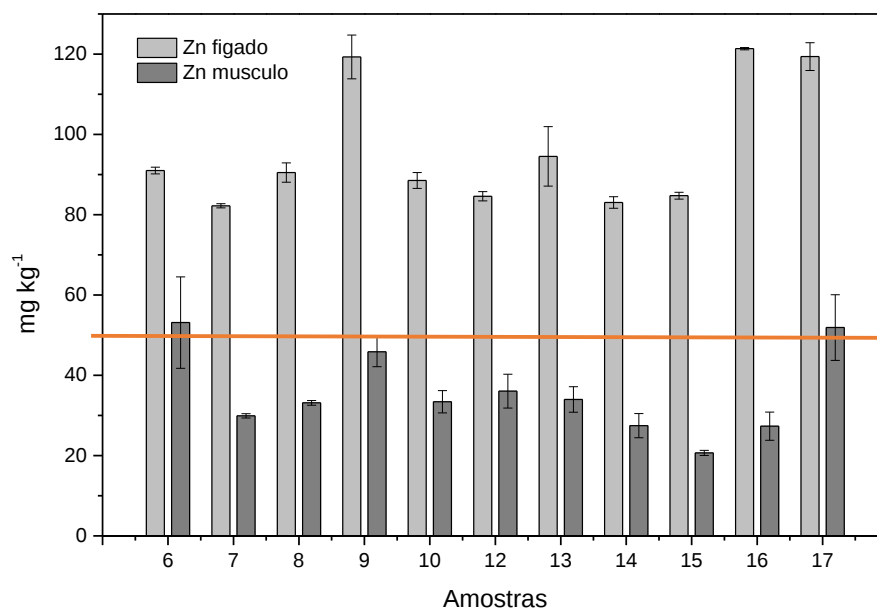
Fonte: Autoria própria

Os resultados das concentrações de metais nas amostras de músculo estão apresentados na Tabela 10, onde as médias foram comparadas estatisticamente ao nível de 5%.

De acordo com o teste de comparação de médias verificou-se que para as amostras de fígado Cd, Co, Pb, Zn e Mn e Co o músculo as concentrações diferiram entre os indivíduos, no entanto para Ni, Pb e Zn no músculo e Ni no fígado houve semelhança entre as concentrações e os indivíduos analisados.

Verifica-se através das Figuras 9, 10, 11 e 12 que os metais possuem maior afinidade pelo fígado quando comparada à afinidade dos mesmos pelo músculo. O fígado possui um aporte sanguíneo maior em relação ao músculo, que faz com que os metais que estão ligados as proteínas plasmáticas ao passar pelo fígado tenham mais afinidade pelas proteínas do fígado do que do sangue, assim acumulando mais metais no fígado em relação ao músculo (KLAASSEN, C. WATKINS, B. J. 2012).

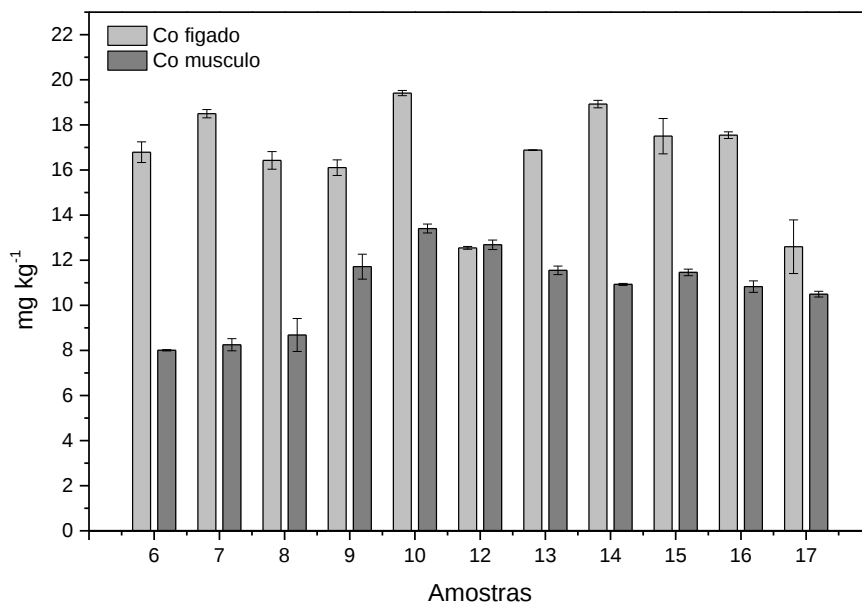
Figura 9- Concentração do metal Zn em amostras de fígado e músculo



— ANVISA – Limite máximo permitido para consumo

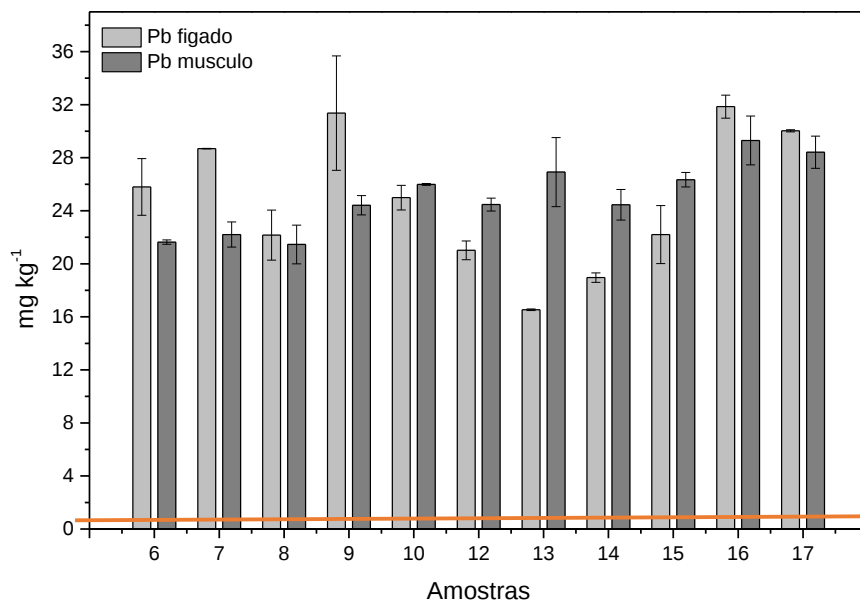
Fonte: Autoria própria

Figura 10 – Concentração do metal Co em amostras de fígado e músculo



Fonte: Autoria própria

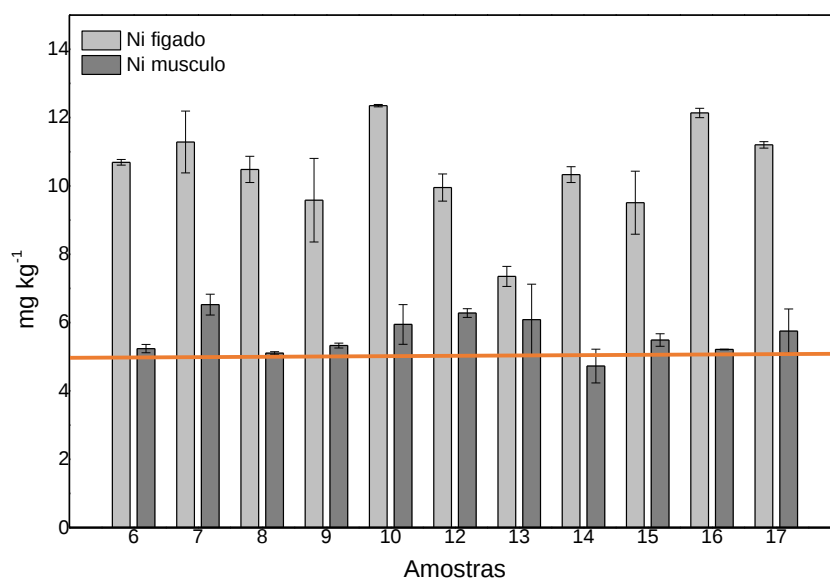
Figura 11 – Concentração do metal Pb em amostras de fígado e músculo



— ANVISA – Limite máximo permitido para consumo

Fonte: Autoria própria

Figura 12 – Concentração do metal Ni em amostras de fígado e músculo



— ANVISA – Limite máximo permitido para consumo

Fonte: Autoria própria

Para quantificar tal acumulação dos metais nos tecidos é importante calcular o fator de bioacumulação.

5.4.1 Fator de bioacumulação (FBA) para água e sedimento

Os resultados referentes ao FBA são apresentados na Tabela 11, para amostras de músculo e fígado.

Tabela 10 – Fator de bioacumulação para sedimento e água

FBAs							
	Cd	Mn	Zn	Cu	Ni	Co	Pb
Fígado	0,98	0,01	0,10	-	0,23	0,69	0,45
Músculo	-	-	0,04	-	0,12	0,44	0,45
FBAa							
	Cd	Mn	Zn	Cu	Ni	Co	Pb
Fígado	-	19,58	-	-	107,8	129,25	-
Músculo	-	-	-	-	55,9	82,15	-

Fonte: Autoria própria

De acordo com os autores Klavin, et al. (1998) como cita Chiba, W. Passerini, MD. Tundisi, JG. (2011) se o FBA for ≥ 1 considera-se o contaminante bioacumulado no tecido.

Verifica-se pela Tabela 11 que os valores de FBAa foram maiores em relação ao FBAs para o Co e Ni, tanto para o músculo como para o fígado, devido ao maior contato com a água do que com sedimento. No entanto o FBA de ambos, água e sedimento, foram maiores para o fígado, mostrando a afinidade dos metais pelo tecido hepático em relação ao tecido muscular.

Tilápias tendem a ficar no fundo de lagoa tem contato maior com o sedimento, o que faz com que as chances de contato com contaminante e por consequência a acumulação destes seja maior. Como o sedimento foi classificado como poluído através do cálculo de IPM, os peixes desse ambiente tendem a bioacumular esses metais, como de fato comprovou os fatores de FBAs.

As rotas de contaminação podem ser através do contato direto com a água e material sedimentar, e através da ingestão de água, material particulado, plantas entre outros. O FBAa

pontua tanto para o fígado como para o músculo que a contaminação da água do ambiente está diretamente relacionada com a acumulação de metais no organismo do peixe.

Como em estudos semelhantes (Voigt, C. L. et. al. 2014; Younis, A. N. et. al. 2015) os fatores de bioacumulação comprovam a afinidade dos metais para os tecidos do fígado em relação ao músculo indicando o fígado como o tecido de maior afinidade de bioacumular metais.

5.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR METAIS EM *Oreochromis niloticus*

Os resultados obtidos para as respostas celulares medidas de estresse oxidativo induzido por metais estão apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16. Comparou-se os resultados encontrados com um grupo controle.

Figura 13 - Concentração de tióis não proteicos

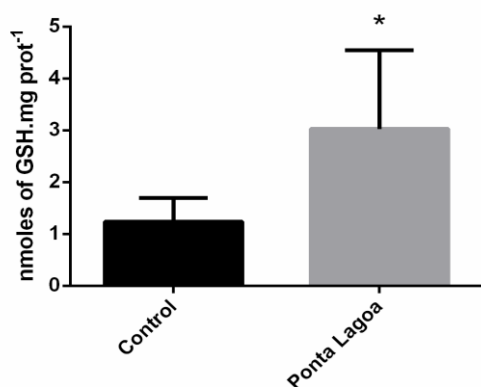


Figura 14 - Atividade da Glutathione S-transferase

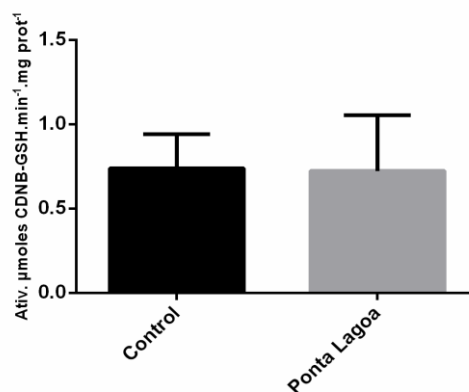


Figura 15 - Peroxidação lipídica

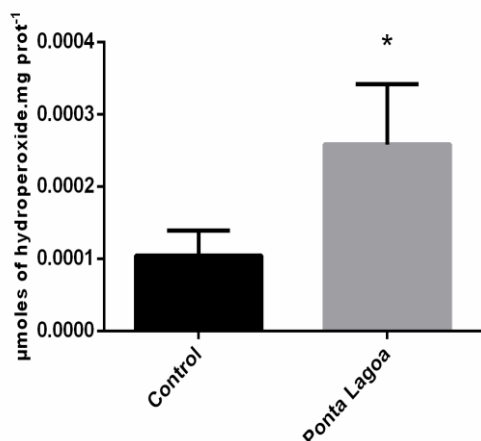
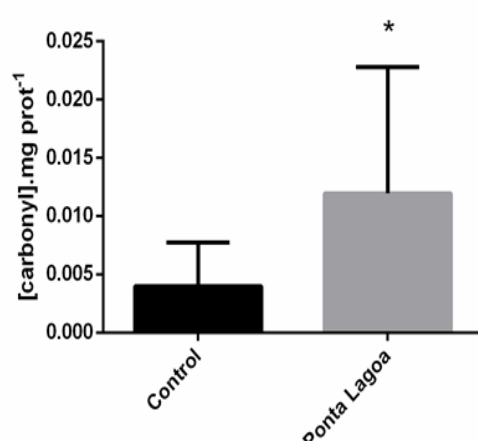


Figura 16 - Carbonilação de proteínas



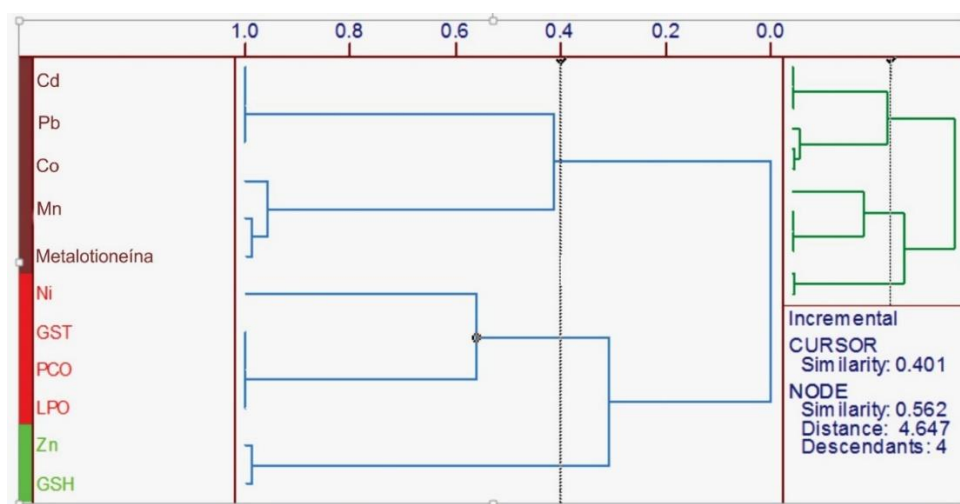
Fonte: Autoria Própria

De acordo com os resultados apresentados pode-se verificar que há indicativo de estresse nas células do fígado. Quando há contato de estressores no meio celular, o metabolismo de defesa é ativado para minimizar o efeito do xenobiótico na célula. No entanto se o sistema de defesa não responde, danos ocorrem no ambiente celular.

Como apresentado nas Figuras 13, 14, 15 e 16 há um aumento na carbonilação e na peroxidação em relação ao grupo controle. O aumento no níveis de GSH é considerado indicativo de estresse oxidativo, no entanto quando as defesas antioxidantes são insuficientes ou inativas danos oxidativos tais como a peroxidação lipídica pode ocorrer. Esse processo acontece quando existe um excesso de metais que interagem com H_2O_2 resultando no aumento de radicais hidroxilas via reações de Fenton, esses radical é a causa da peroxidação (BALLESTEROS et al. 2009; MANOJ AND PADHY, 2013; FLORENCE et. al. 2002 como cita PALERMO, F. F. et. al. 2015).

Assim para verificar a semelhança entre as concentrações de metais encontradas e os bioensaios utilizou-se o método de análise por agrupamento hierarquico (HCA). A Figura 17 apresenta os resultados obtidos.

Figura 17 – Análise por agrupamento hierárquico dos metais no fígado e bioensaios



Fonte: Autoria própria

A partir da HCA apresentada da Figura 17 podemos verificar a relação entre o teor de metais e a metalotioneína no fígado. A alta capacidade de acumulação do fígado resulta na presença de proteínas chamada metalotioneínas que ligam-se aos metais diminuindo sua toxicidade e permitindo o acúmulo de altas concentrações (ROESIJUDI, G. 1996; REYES, J. L. et. al. 2013; PALERMO, F. F. et. al. 2015).

Como a metalotioneína regula o processo de metais essenciais para o organismo, e o Zn é um micronutriente que trabalha na regulação celular ligado à proteínas como metalotioneína, o mecanismo primário de trabalho com o Zn é com a GSH. Porém em excesso desse metal pode esgotar a GSH resultando então em estresse oxidativo (JOZEFCAK, M. et.al. 2012).

Uma segunda semelhança é observada no caso dos indicadores de danos celulares com o metal Ni. Estudos de exposição de peixes a concentrações de Ni concluíram que há alterações nas defesas antioxidantes em presença de Ni, causando peroxidação lipídica no fígado e danos no DNA, concluindo que o nível de Ni permitido pela legislação brasileira, não é seguro (PALERMO, F. F. ET. AL. 2015).

A contaminação ambiental por meios antropicos está cada vez maior, assim surge a necessidade de se entender como a contaminação esta afetando o ambiente. Para isso bioindicadores são necessários, como por exemplo os peixes.

A partir dos resultados encontrados neste estudo pode-se perceber que a tilápia é um bom indicador na contaminação de metais, pois é uma espécie de facil adaptação em ambientes bastante prejudicados pela poluição e também muito importante do ponto de vista economico e alimentar.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos conclui-se que as amostras de água do reservatório em estudo contêm Co, Mn e Ni em sua fração dissolvida.

O sedimento do reservatório está poluído por metais potencialmente tóxicos de acordo com o índice de poluição por metais e as concentrações encontradas para Cd, Cu e Pb representam perigo potencial aos organismos expostos, pois situam-se entre os índices de NEL e NEP. O metal Zn apresentou concentração acima de NEP, indicando que ele pode estar diretamente relacionado aos efeitos biológicos adversos.

As concentrações de Ni e Pb no músculo de *Oreochromis niloticus* encontram-se acima do valor estipulado pela ANVISA para consumo humano, indicando que há contaminação das espécies em estudo por tais metais, bem como risco à saúde humana ao se consumir esses peixes. As concentrações de metais potencialmente tóxicos no fígado foram mais altas em relação as concentrações encontradas no músculo, indicando maior afinidade entre os metais e o fígado do que os metais e o músculo, fato que foi confirmado também pelo fator de bioacumulação, onde os valores para fígado são maiores em relação aos valores para o músculo.

Tanto para o fígado como para o músculo o metal com maior concentração encontrado foi o Zn, essa maior concentração foi observada também para o sedimento, indicando ser esta a principal fonte de contaminação do peixe.

Os ensaios biológicos mostraram aumento nos níveis de peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e aumento na GSH, bem como a relação através da HCA dos metais com a MT. A partir disso conclui-se que os metais além da contaminação da água e sedimento estão influenciando negativamente os espécimes de *Oreochromis niloticus* desse reservatório.

REFERENCIAS

ABELKOP, A. D. K. **Scientific and Policy Analysis of Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Chemicals: A Comparison of Practices in Asia, Europe, and North America.** Disponível em: < <http://www.stepto.com/news-events-2595.html>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ALMROTH, B. C. et. al. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corksiding wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. **Marine Environmental Research**. v. 66, p. 271-277, 2008.

ALVES, R. I. S. et.al. Avaliação das concentrações de metais pesados em águas superficiais e sedimentos do Córrego Monte Alegre e afluentes, Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Ambiente e Água**. v.5, n.3, 2010.

AMIN, B. et.al. Anthropogenic impacts on heavy metal concentrations in the coastal sediments of Dumai, Indonesia. **Environ Monit Assess**. v.148, p. 291 – 305, 2009.

ANVISA. **Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965.** Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DECRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 27 set. 2015.

ANVISA. **Resolução - RDC n. 42, de 29 de Agosto de 2013.** Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 27 set. 2015.

AOAC (2002). **Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.** Disponível em:< [http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines Dietary Supplements.pdf](http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2015.

APRILE, F.M. BOUVY, M. Distribution and enrichment of heavy metals in sediments at the Tapacurá river basin, northeastern Brazil. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol**. v. 12, p. 1-8, 2008.

ATSDR. (2004). **Toxicological profile for cobalt.** Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2004). **Toxicological profile for copper.** Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2005). **Toxicological profile for nickel.** Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2005). **Toxicological profile for zinc.** Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2007). **Toxicological profile for cádmium**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2007). **Toxicological profile for lead**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2012). **Toxicological profile for chromium**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

ATSDR. (2012). **Toxicological profile for manganese**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2015.

BADER, N. R. ZIMMERMANN, B. Sample preparation for atomic spectroscopic analysis: An overview. **Pelagia Research Library**. v. 3, p. 1733, 2012.

BAKIRDERE, S. et.al. Determination of As, Cd, and Pb in Tap Water and Bottled Water Samples by Using Optimized GFAAS System with Pd-Mg and Ni as Matrix Modifiers. **Journal of Spectroscopy**. v. 2013, p. 1-7, 2013.

BARONE, G. GIACOMINELLI-STUFFLER, R. STORELLI, M.M. Comparative study on trace metal accumulation in the liver of two fish species (Torpedinidae): Concentration–size relationship. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 97, p. 73-77, 2013.

BASTAMI, K. D. et. al. Bioaccumulation and ecological risk assessment of heavy metals in the sediments and mullet *Liza klunzingeri* in the northern part of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**. v. 94, p. 329-334, 2015.

BAYKAN, U. ATLI, G. CANLI, M. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 23, p. 33-38, 2007.

BELLUTA, I. et.al. Impactos provocados por metais potencialmente tóxicos dissolvidos em água e em sedimentos no córrego do Cintra – Botucatu-SP. *Salusvita*, Bauru, v. 27, n. 2, p. 239-258, 2008.

BINEY, C. et. al. **Review of heavy metals**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/v3640e/v3640e04.htm>. Acesso em: 10 set. 2015.

BIRUNGI, Z. et.al. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth**. v.32, p. 1350-1358, 2007.

BOAVENTURA, S. F. HADLICH, G. M. CELINO, J.J. Índices de Contaminação de Metais Traço em Encostas, Manguezais e Apicuns, Madre De Deus, Bahia. **Geociências**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 631-639, 2011.

BOELSTERLI, A. **Mechanistic Toxicology**: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. 1ed. London. Taylor & Francis, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, E. M. S. et. al. Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. **Science of the Total Environment**. v. 521, p. 1-10, mar, 2015.

BRUNORI, C. et.al. Evaluation of an ultrasonic digestion procedure for total metal determination in sediment reference materials. **Analytica Chimica Acta**. V. 510, p. 101, 2004.

CCME (1995). **Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. Disponível em:< <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/226>>. Acesso em: 15 set. 2015.

CCME (1998). **Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. Disponível em:< <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/226>>. Acesso em: 15 set. 2015.

ÇELIK, E. S. et.al. Effects of zinc exposure on the accumulation, haematology and immunology of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, p. 744-753, fev. 2013.

CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação, 2013.

CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Organizadores: BRANDÃO, C. J.et al. São Paulo: CETESB. Brasília: ANA, 2011.

CONAMA. **Resolução 357, de 17 de março de 2005, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 01 out. 2015.

CONAMA. **Resolução Nº 344, de 25 de Março de 2004, Publicada no DOU nº 087, de 07/05/2004. Alterada pela Resolução nº 421 de 2010. Revogada pela Resolução nº 454 de 2012**. Disponível em:< <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>>. Acesso em: 01 out. 2015.

COSTA, A. C. S. et.al. Decomposição e solubilização de sólidos inorgânicos. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1.ed. Piracicaba. 2010. cap.5, p. 141-156.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; PIOVANI, M.R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no parque estadual turístico do Alto do Ribeira – Petar, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2006.

DAILIANIS, S. PATETSINI, E. KALOYIANNI, M. The role of signalling molecules on actin glutathionylation and protein carbonylation induced by cadmium in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). **The Journal of Experimental Biology**. v. 212, p. 3612-3620, 2009.

DREXLER, J. et.al. **Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals**. Disponível em: <http://www2.epa.gov/osa/issue-paper-bioavailability-and-bioaccumulation-metals>. Acesso em: 07/10/2015.

DUARTE, C. A. et al. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). **Marine Pollution Bulletin**. v.62, p. 1895-1904, 2011.

EDLAK, J. LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192-205, 1968.

ENEJI, I. S. SHA'ATO, R. ANNUNE, P.A. Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish (*Tilapia Zilli* and *Clarias Gariepinus*) Organs from River Benue, North - Central Nigeria. **Pak. J. Anal. Environ. Chem**. v. 12, n. 1 e 2, p.25-31, 2011.

ERCAL, N. GURER-ORHAN, H. AYKIN-BURNS, N. Toxic Metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.1, p. 529-539, 2001.

ERICKSON, R. J. et.al. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. In: DI GIULIO, R.T. HINTON, D. E. **Toxicology of Fishes**. CRC Press, 2008.

FAO (2015). **Cultured Aquatic Species Information Programme**. Disponível em:< http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. Acesso em: 25 set. 2015.

FAO. **Aquacultura Brasileira**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ac562p/AC562P03.htm>> . Acesso em: 15 jun. 2015.

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. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 4, n.158-165, 2007.

FERREIRA, C.W.S. **Sedimentação em um reservatório de água no semiárido de Pernambuco**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado em Geografia Física do Departamento de Ciências) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

GARCÍA, R. BÁEZ, A. P. Atomic Absorption Spectrometry (AAS). In: FARRUKH, M. A. **Atomic absorption spectroscopy**. InTech. Croácia, 2011, p. 1-9.

GOVIND, P. MADHURI S. Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes. **Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences**. v. 10, p. 17-23, fev. 2014.

GÜVEN, D.E. AKINCI, G. Comparison of Acid Digestion Techniques to Determine Heavy Metals in Sediment and Soil Samples. **Gazi University Journal of Science**. v. 24, p. 24-39, 2011.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, n. 5, p. 1147 – 1150, 2007.

HARRIS, C.D. **Quantitative Chemical Analysis**. 8ed. W. H. Freeman and Company. 2010. p. 479-483.

Heavy Metals in Sediment and Soil Samples. **Gazi University Journal of Science**. v. 24 p. 29, 2011.

HEIN, G. BRIANESE, R. H. 2004. Modelo Emater de produção de tilápia. Disponível em <http://www.emater.pr.gov.br/arquivos/File/Comunicacao/Premio_Extensao_Rural/1_Premio_2005/ModeloEmaterProd_Tilapia.pdf>. Acesso em: 04 set. 2015.

HERMENEAN, A. et.al. Histopatological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 119, p. 198-205, 2015.

HINTON, D. E. et. al. Liver Toxicity. In: DI GIULIO, R.T. HINTON, D. E. **Toxicology of Fishes**. CRC Press, 2008.

HOLLER, F.J. SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ed. Porto Alegre. Bookman, 2009. p. 261.

HOWARD, I. C. OLULU, B. A. Metal Pollution Indices of Surface Sediment and Water from the Upper Reaches of Sombriero River, Niger Delta, Nigeria. **Our Nature**. v. 10, p. 206-216, 2012.

IZÁRIO FILHO, H. J. et.al. State-of-the-Art and Trends in Atomic Absorption Spectrometry. In: FARRUKH, M. A. **Atomic absorption spectroscopy**. InTech. Croácia, 2011, p. 13.

JESUS, H. C. et. al. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha De Vitória-ES. **Quim. Nova**, Vol. 27, N. 3, 378-386, 2004.

JIANG, Z. Y. HUNT, J.V. WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. v. 202, p. 384-389, 1992.

JITAR, O. et.al. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea. *New Biotechnology*. v. 32, n.3, p. 369-378, maio, 2015.

JOZEFCZAK, M. et.al. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* v. 13, p. 3145-3175, 2012.

KAMALA-KANNAN, S. et.al. Assessment of heavy metals (Cd, Cr and Pb) in water, sediment and seaweed (*Ulva lactuca*) in the Pulicat Lake, South East India. *Chemosphere*. v. 71, p. 1233 – 1240, fev, 2008.

KAZI, T.G. et.al. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials*. v. 161, p. 1391, 2009.

KEEN, H. JAKOBY, N. Mechanism for the several activities of the glutathione. *The Journal Biological Chemistry*. v. 251,n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KLAASSEN, C. WATKINS, B. J. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2ª ed, Porto Alegre. AMGH. 2012. p. 179

KUMAR, B. et. al. Bioaccumulation of heavy metals in muscle tissue of fishes from selected aquaculture ponds in east Kolkata wetlands. *Annals of Biological Research*. v. 2. p. 125-134, 2011.

KUMARI, K. KHARE, A. DANGE, S. The Applicability of Oxidative Stress Biomarkers in Assessing Chromium Induced Toxicity in the Fish *Labeo rohita*. *BioMed Research International*. v. 2014, p. 1-11, 2014.

LEVINE, R.L. WILLIAMS, J.A. STADTMAN, E.P. SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. v. 233, p. 346-357, 1994.

LIMA, E.S. ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 37, n. 3, set./dez. 2001.

LIU, J. GOYER, R. A.WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D. **Toxicology: the basic science of poisons**. 7.ed. McGraw-Hill. 2008. p.932- 971.

LIVINGSTONE, D. R. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue Méd. Vét.* v.154, n.6, p.427-430, 2003.

LOPES, A. P. et. al. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. **The Science of the Total Environment**. v. 280, p. 153-163, 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, set, 2012.

MAHBOOB, S. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Life Science Journal**. v. 10, p. 337, 2013.

MAPA (2015). **Especificações dos Fertilizantes Minerais Simples**. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/fertilizantes/fiscalizacao-e-qualidade>>. Acesso: 01 out. 2015.

MARENGONI, N. G. et.al. Bioacumulação de metais pesados em tilápia do nilo e retenção no solo e sedimento dos viveiros com adição de probióticos na dieta. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 1158-1167, jul/ago. 2014.

MASSABNI, A.C. **Os metais e a saúde humana**. Disponível em:<http://www.crq4.org.br/quimica_viva_os_metais_e_a_saude_humana>. Acesso em: 10 jun. 2015.

MELO, L. C. A. SILVA, C. A. Influência de métodos de digestão e massa de amostra na recuperação de nutrientes em resíduos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 556, 2008.

NAKAYAMA, S. M. M. et. al. Heavy Metal Accumulation in Lake Sediments, Fish (*Oreochromis niloticus* and *Serranochromis thumbergi*), and Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Lake Itzhi-tezhi and Lake Kariba, Zambia. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 59, p. 291-300, 2010.

NEMATİ, K. et.al. Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. **Journal of Hazardous Materials**. v. 182, p.453, 2010.

OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

OLOWU, R.A. et.al. Determination of Heavy Metals in Fish Tissues, Water and Sediment from Epe and Badagry Lagoons, Lagos, Nigeria. **E-Journal of Chemistry**. v. 7, p. 215-221, 2010.

OWENS. P. N. Sediment behavior, functions and management in River Basins. In: OWENS. P. N. **Sustainable Management of Sediment Resources**. 1ª ed. Oxford:SedNet, 2008. p. 3-9.

PALERMO, F. F. et. al. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 116, p.19-28, 2015.

PAULA FILHO, F. J. et.al. Background values for evaluation of heavy metal contamination in sediments in the Parnaíba River Delta estuary, NE/Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 91, p. 424–428, 2015.

PEREIRA, E. et. al. The contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments – Rio de Janeiro / Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 79, p. 739-750, 2007.

PINTILIE, S. et. al. Modelling and simulation of heavy metals transport in water and sediments. **Environmental Engineering and Management Journal**. v.6, n. 2, p. 153-161, mar/abril. 2007.

POPMA, T. MASSER, M. Tilapia. Life History and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center**. n. 283. 1999.

PULLES, T. et al. Emission factors for heavy metals from diesel and petrol used in European vehicles. **Atmospheric Environment**. v. 61, p. 641–651, dez. 2012.

REDDY, U. A. et.al. Biomarkers of oxidative stress in rat for assessing toxicological effects of heavy metal pollution in river water. **Environ. Sci. Pollut. Res**. v. 22, p. 13453-13463, 2015.

REYES, J. L. et. al. Tight Junction Proteins and Oxidative Stress in Heavy Metals-Induced Nephrotoxicity. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-14, 2013.

ROBINSON, L e THORN, I. **Toxicology and Ecotoxicology in Chemical Safety Assessement**. USA. Blackwell Publishing Ltda. 2005. p. 68-69.

ROESIJUDI, G. Metallothionein and Its Role in Toxic Metal Regulation. **Comp. Biochem. Physiol**. v. 113, n. 2, p. 117-123, 1996.

SAFAROVA, V.I. et.al. Methods of Sample Preparation of Soil, Bottom Sediments, and Solid Wastes for Atomic Absorption Determination of Heavy Metals. **Inorganic Materials**. v. 47, n. 14, p. 1512-1571, 2011.

SANI, U. Determination of some heavy metals concentration in the tissues of Tilapia and Catfishes. **Biokemistri**. v. 23, n. 2, p.73 – 80, jun, 2011.

SANTANA, G. P. BARRONCAS, P. S. R. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus – (AM). **Acta Amazonica**. v. 37, p. 111-118, 2007.

SARALA THAMBAVANI, D. UMA MAGESWARI T.S.R. Metal Pollution Assessment in Ground Water. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**. v. 2, p. 122-129, nov. 2013.

SASTRE, J. SAHUQUILLO, A. VIDAL, M. RAURET, G. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. **Analytica Chimica Acta**. v. 462, p. 59, 2002.

SedNet. **Contaminated Sediments in European River Basins**. Disponível em: <www.SedNet.org>. Acesso em: 15 jun. 2015.

SHRIVER, et.al. **Química Inorgânica**. 4ed. Porto Alegre. Bookman, 2008.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SQUADRONE, S. et. al. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere**. v. 90, p.358-365, 2013.

TAJIRI, A. N. et.al. Determination of presence and quantification of cadmium, lead and copper in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets obtained from three cold storage plants in the State of Parana, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 31, p. 361-365, abr/jun. 2011.

TESSIER, A. CAMPBELL, P. G. C. Partitioning of trace metals in sediments: Relationships with bioavailability. **Hydrobiologia**. v.149, p. 43-52. 1987.

TORRES, M. C. L. SOARES, N. F.F. MAIA, J.F. Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, v. 24, p. 243-248, abr/jun, 2004.

U.S. EPA. (1996) **Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils. Method EPA-3050B**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>> Acesso em: 12 jan. 2015.

U.S.EPA. (1992). **Acid Digestion of Waters for Total Recoverable or Dissolved Metals for Analysis by FLAA or ICP Spectroscopy. Method EPA-3005A**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3005a.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

U.S.EPA (2000). **Bioaccumulation Testing and Interpretation for the Purpose of Sediment Quality Assessment**. Disponível em: http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/biotesting_index.cfm Acesso em: 02 set.2015.

U.S.EPA. (2012). **Sources, Stressors & Responses**. Disponível em: <http://www3.epa.gov/caddis/ssr_met_int.html>. Acesso em: 02 set. 2015.

U.S.EPA. (2004). **Sample Dissolution**. Disponível em:<<http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-05/documents/402-b-04-001b-13-final.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2015.

VAN DER OOST, R. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 65.

VEAL, A. E. et.al. Distinct Roles for Glutathione S-Transferases in the Oxidative Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 38, pp. 35523–35531, set. 2002.

VIARENGO, A. et.al. A simple spectrophotometric method for Metallothionein evaluation in marine organisms: na application to editerranean and antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**. v. 44, p. 69-84, 1997.

VOIGT, C. L. et.al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 22, p. 8242-52, 2014.

VOUTSAS, E. MAGOULAS, K., TASSIOS D. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. **Chemosphere**. v. 48, 645-651, 2002.

WANG, G. et.al. Modeling the source contribution of heavy metals in surficial sediment and analysis of their historical changes in the vertical sediments of a drinking water reservoir. **Journal of Hydrology**. v. 520, p. 38, 2015.

WUANA, R. A. OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **International Scholarly Research Network**. v.2011, p. 2, 2011.

YOUNIS, A. N. et. al. Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish, Squids and Crustaceans from the Red Sea, Jeddah Coast, Saudi Arabia. **Open Journal of Marine Science**. v. 5, p. 369-378, out. 2015.

ZHANG, C. et.al. Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. **Environment International**. v. 73, p. 270-281. 2014.