

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CLISSIANE SOARES VIANA PACHECO

**Determinação do teor total de espécies inorgânicas e de
metalotioneína em amostras de peixe *Mugil Cephalus*
provenientes do estuário da Baía do Pontal**

JEQUIÉ-BA

FEVEREIRO/2015

CLISSIANE SOARES VIANA PACHECO

Determinação do teor total de espécies inorgânicas e de metalotioneína em amostras de peixe *Mugil Cephalus* provenientes do estuário da Baía do Pontal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

JEQUIÉ – BA

FEVEREIRO / 2015

Pacheco, Clissiane Soares Viana.

P118 Determinação do teor total de espécies inorgânicas e de metalotioneína em amostras de peixe Mugil Cephalus provenientes do estuário da Baía do Pontal/Clissiane Soares Viana Pacheco.- Jequié, UESB, 2015.

35 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação (Pós-graduação em Química)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientador: Profº. Drº. Erik Galvão Paranhos da Silva.

1. Peixes Mugil Cephalus provenientes do estuário da Baía do Pontal – Determinação do teor total de espécies inorgânicas em amostras de fígado 2. Metalotioneína – Determinação de concentrações de elementos tóxicos em peixe da espécie Mugil Cephalus proveniente da Baía do Pontal I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-PGQUI

Clissiane Soares Viana Pacheco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **20/02/2015**.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva (UFBA, Salvador, 2009)
(Orientador)



Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus (UFBA, Salvador, 2010)



Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UFBA, Salvador, 2011)

À minha família (minha filha, meus pais e minha irmã), pelo apoio, carinho e incentivo durante essa jornada. Sem vocês eu não teria entusiasmo para concluir mais uma etapa na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido concluir mais uma etapa de minha vida. Graças, Senhor!

Aos meus pais, Edinaldo Pacheco e Marinalva Pacheco, minha irmã Tamara Pacheco e minha filha Anna Beatriz Pacheco por todo amor, apoio e incentivo durante toda a minha caminhada.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-Jequié.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida através do Programa.

Ao Prof. Dr. Erik Galvão pelo apoio e oportunidade de realizar esse trabalho.

Os professores Dr. Nicolás Adrián Rey e Dr^a Rachel Ann Hauser-Davis, por todo apoio concedido, em tirar dúvidas sobre o conteúdo, por ter me recebido na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro para realização de alguns experimentos. Aos seus alunos do LABSO-BIO: Daphne, Isabella, Ana Beatriz, Maria Victória, Sergio, Anna de Falco, Raquel Lavradas, pelo apoio, paciência e amizade nesse pouco tempo.

Ao Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani e ao pessoal do laboratório de Proteômica no Centro de biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz, por todo apoio concedido em realizar uma parte dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim e o laboratório de águas na UESC, por ter permitido a utilização de alguns equipamentos do laboratório.

Ao Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus e o laboratório de química analítica na UESC, por ter permitido a utilização de equipamentos.

A Prof^a. Dr^a. Cristiane Leal e o laboratório de leite da UESB, por ter permitido a utilização de equipamentos.

Aos colegas do Labra pelo apoio e amizade.

Ao Grupo de Pesquisa de Química Analítica do Sul da Bahia: Luana, Madson, Mayara, Lucas, Vinícius Henrique, Pedro, Bruna, Luís Henrique, Roberta e Givaldo pelo apoio, amizade por terem me acolhido tão bem e por todo conhecimento compartilhado;

E, a todos os professores da UESB e UESC pelos ensinamentos e pela convivência durante esse período.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Área de estudo e os respectivos pontos de amostragem.	
5	
Figura 2. Gráfico que representa a relação entre os dois fatores (PC1 e PC2) com as variáveis estudadas.	11
Figura 3. Gráfico de “escores” PC1 x PC2 para os elementos com as variáveis estudadas.	12
Figura 4. Quantificação de metalotioneína total em amostra de fígado na espécie <i>Mugil Cephalus</i> . P1- Rio Santana, P2- Rio Cachoeira, P3- Rio Itacanoeira P4 e P5- Baía do Pontal.	13
Figura 5. Quantificação de metalotioneína total em amostra de brânquias na espécie <i>Mugil Cephalus</i> . P1- Rio Santana, P2- Rio Cachoeira, P3 - Rio Itacanoeira, P4 e P5 Baía do Pontal.	14
Figura 6. Eletroforese unidimensional- bandas de metalotioneína na faixa de 14 kDA (faixa B-J) após a purificação da amostra com tratamento térmico. A faixa A mostra o padrão de peso molecular.	15

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Meses das coletas e quantidades de indivíduos da espécie Mugil Cephalus em diferentes pontos.	4
Tabela 2. Condições operacionais do ICP-MS.	5
Tabela 3. Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) em material de referencia Certificado.	7
Tabela 4. Concentrações da primeira amostragem de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em 5 pontos.	8
Tabela 5. Concentrações da segunda amostragem de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em 5 pontos.	9
Tabela 6. Limites máximos de espécie inorgânicas permitido em alimentos ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) estabelecido pelo ministério da Saúde na Portaria 685/98 Resolução- RDC N° 42/13 e Decreto 55871/65.	10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

BSA- Albumina bovina

CV- coeficiente de variação

DORM 3- Material de referência certificado de proteína de peixe para metais traços

DTNB- ácido 5,5'- dithiobis – (2 – nitrobenzóico)

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

GSH- Glutathiona reduzida

ICP-MS- Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

LD- Limite de detecção

LQ-Limite de quantificação

MT- Metalotioneína

NRCC- Nacional Research Council Canadá

PAGE- poliacrilamida

PCA- Análise de componentes principais

PMFS- Fluoreto de fenil metil sulfonil

RSD- Desvio padrão relativo

SDS- Dodecil-sulfato de sódio

Determinação do teor total de espécies inorgânicas e de metalotioneína em amostras de peixe *Mugil Cephalus* provenientes do estuário da Baía do Pontal

Autor(a): Clissiane Soares Viana Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em amostras de fígado da espécie *Mugil Cephalus* proveniente da Baía do Pontal em duas amostragens. E quantificar a metalotioneína total em fígado e brânquias em três amostragens. Foi realizado uma digestão ácida para determinar as concentrações dos elementos, onde 100 mg da amostra foi homogeneizado com 0,5 mL de ácido nítrico, deixando em overnight durante 12 horas, a mineração foi realizada utilizando um banho maria a 100 °C durante 5 horas. Para a determinação dos elementos foi empregada à técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. A quantificação da metalotioneína total foi realizada através da reação de Ellman, onde se utiliza o DTNB para quantificar os grupos tiol presente nas amostras, após a determinação foi aplicado uma concentração de 20 µg de proteína em um gel unidimensional para observar o aparecimento das bandas da metalotioneína na faixa de 14 kDa. Na determinação dos elementos pôde-se observar que o cobre apresentou concentrações maiores que o permitido pelo ministério de saúde nas duas amostragens, sendo que as maiores concentrações foram encontradas no ponto 3, Rio Itacanoeira. Foi aplicado a análise de PCA nas amostras com intuito de observar a formação de grupos entre as duas amostragens. As amostras de fígado apresentaram concentração maiores de metalotioneína em relação as brânquias, por ser um órgão de armazenamento e desintoxicação de metais tóxicos no corpo.

Palavras-chave: Metalotioneína, Contaminação, Espécies inorgânicas.

Determination the total level of inorganic species and metallothionein in Mugil Cephalus fish samples from the Pontal Bay estuary

Autor(a): Clissiane Soares Viana Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

Abstract : This study aimed to determine the concentrations of Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn in liver samples of the species *Mugil Cephalus* from the Pontal Bay in two collections. And quantify total metallothionein in liver and gills in three collections. An acid digest was performed to determine the concentrations of the elements, where 100 mg of the sample was homogenized with 0.5 mL of nitric acid, leaving overnight for 12 hours, mining was performed using a water bath at 100 ° C for 5 hours . For the determination of elements was used to mass spectrometry with inductively coupled plasma. The quantification of the total metallothionein was performed by Ellman reaction, which is used to quantify the DTNB thiol groups present in the sample after the determination was applied to a protein concentration of 20 µg in a one-dimensional gel to observe the appearance of bands metallothionein in the 14 kDa range. In determining the elements could be observed that copper had higher concentrations than allowed by the health ministry in the two samples, with the highest concentrations were you will find in section 3, Rio Itacanoeira. PCA analysis in samples with a view to observe the formation of groups between the two collections was applied. The liver samples showed higher concentration of metallothionein over the gills, as a storage organ and detoxification of toxic metals in the body.

keywords: metallothionein, contamination, inorganic species

SUMÁRIO

	Pag.
1. Introdução	1
2. Metodologia	3
2.1 Área de Estudo	3
2.2 Amostragem	4
2.3 Determinação de espécies inorgânicas	4
2.4 Extração da Metalotioneína	5
2.5 Quantificação da Metalotioneína	6
2.6 Eletroforese unidimensional	6
2.7 Análise multivariada	7
3. Resultados e Discussão	7
3.1 Avaliação da exatidão do método proposto	7
3.2 Determinação da concentração de espécies inorgânicas na Espécie de peixe Mugil Cephalus (Tainha)	7
3.3 Análise de Componentes Principais (PCA)	11
3.4 Quantificação da metalotioneína	13
3.5 Eletroforese Unidimensional	15
4. Conclusão	16
5. Referências	17

1. INTRODUÇÃO

O aumento significativo de contaminação em ambientes costeiros, proveniente da poluição por resíduos domésticos e atividades agrícolas^{1,2} vem se alargando nos municípios do litoral ocasionando uma série de impactos ao ecossistema, devido a presença de metais tóxicos oriundos dessa contaminação³. Com isso, estudos sobre problemas relacionados com contaminação em ecossistemas aquáticos vêm sendo desenvolvidos, pois o homem lança diariamente contaminantes na biota, tornando uma via de transferência de poluentes para a população humana^{4,5}.

Os impactos ambientais no município de Ilhéus vêm se alargando com o lançamento de efluentes industriais, rejeitos domésticos, agrotóxicos, construção do porto, dentre outras ações antrópicas⁶, onde as áreas litorâneas são mais prejudicadas porque são submetidas a essas exposições diárias⁷.

Entre os diversos meios de contaminação aquática os metais potencialmente tóxicos se destacam, pois são prejudiciais para a maioria dos organismos vivos em nível de exposição e de absorção. Em concentrações altas causam sérios problemas aos organismos⁸, sendo a sua bioacumulação um dos maiores problemas da introdução destes metais em sistemas aquáticos⁹.

Efeitos de agentes químicos podem ser mensurados objetivando um diagnóstico simples e eficiente, para detectar os efeitos destes poluentes sob a biota¹⁰. Para fornecer estes dados, tem sido recomendado a incorporação da análise de biomarcadores em programas que busquem avaliar a exposição e as alterações causadas por contaminantes em ambientes marinhos^{1,11}. Com isso, têm-se utilizado no monitoramento da contaminação, a análise química de tecidos que permite a identificação e avaliação do impacto dos contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos¹².

Os biomarcadores são ferramentas modernas para estimar os efeitos da exposição de contaminantes sobre o ecossistema¹³, dentre eles, a metalotioneína (MT) é utilizada para avaliar a toxicidade e bioacumulação de metais tóxicos¹³. Pois são proteínas ricas em cisteína que apresentam uma estabilidade ao calor e possuem um ligante metálico em sua estrutura. Devido

à formação do complexo metal-tiol, a síntese da proteína só ocorre induzida por metais^{14,15}. A presença de grupos tiol (SH-) permite que estas proteínas se liguem ao excesso de metais essenciais e não essenciais, protegendo dessa forma o organismo da toxicidade destes compostos inorgânicos¹⁶. A produção da metalotioneína é induzida pelo aumento da entrada de metais na célula, o que torna estas metaloproteínas biomarcadores específicos da contaminação por metais¹⁷. Participa de diversas funções nos organismos, dentre elas o envolvimento na ligação de metais bivalentes, o sequestro de radicais livres¹⁸ e agindo contra o estresse oxidativo¹⁹.

Muitas espécies de peixes, crustáceos e moluscos são colhidas na região, fornecendo alimento básico e renda para as comunidades costeiras²⁰. Os peixes desempenham um importante papel nos ecossistemas aquáticos²¹ possuindo uma alta qualidade de proteína, alta mobilidade e excelente digestibilidade²². Quando contaminado representa risco à população humana, pois é bem estabelecido que a alimentação seja uma das principais vias de exposição de substâncias tóxicas²³.

De acordo com MILINKOVITCH *et al.*, a espécie tainha (*Mugil cephalus*) é considerada um bioindicador para avaliação da poluição em sistemas aquáticos²³⁻²⁵. Alimenta-se principalmente de zooplâncton e organismos bentônicos, pois possui a tolerância à salinidade extrema²⁶ e está distribuída mundialmente em águas costeiras, lagos, baías e estuários²⁷.

O objetivo do trabalho foi determinar as concentrações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em amostras de fígado da espécie *Mugil Cephalus*. E quantificar a metalotioneína total em fígado e brânquias da mesma espécie.

2. METODOLOGIA

2.1. Área de estudo

A Figura 1 mostra a área estudada e os pontos de amostragem das amostras. Foram escolhidos cinco pontos cujas coordenadas e localização são P1 14°81'73"41 S e 39°04'20"48 Rio Santana, P2 14°81'45"60 S e 39°04'50"54 Rio Cachoeira, P3 14°80'97"45 S e 39°04'57"40 Rio Itacanoeira (fundão), P4 14°80'15"67 S e 39°03'70"25 e P5 14°80'90"80 S e 39°03'23"45, Baía do Pontal.

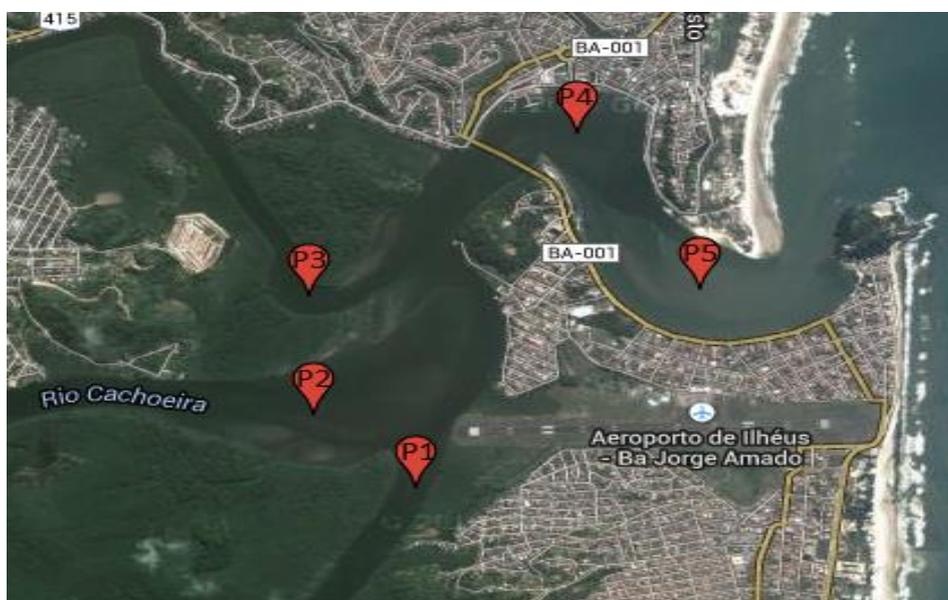


Figura 1- Área de estudo e os respectivos pontos de amostragem. Fonte: Google Earth. Acessado em 07 de janeiro de 2015.

A Bacia do Rio Cachoeira é a maior, em extensão, dentre as bacias localizadas na região hidrográfica da Bacia do Leste, onde conflui com os rios Itacanoeira (ou Fundão) e Santana formando um estuário em um local conhecido como Coroa Grande, no Município de Ilhéus²⁸. Possui uma grande quantidade de habitantes por agrupar os principais municípios dessa região, além de apresentar marcante diversidade de áreas agrícolas que se distinguem por diferentes características naturais e sistemas de ocupação antrópica. Apresenta uma área de drenagem de cerca de 4600 km², abrangendo treze municípios: Firmino Alves, Floresta Azul, Santa Cruz da Vitória, Itajú do

Colônia, Ibicaraí, Lomanto Júnior, Itapé Buerarema, Jussari, Itabuna, Ilhéus, Itororó e Itapetinga, tendo uma população estimada de 600 mil habitantes, distribuída nos municípios que se encontram nessa bacia²⁹. Os rios Cachoeira e Santana tem uma influência no município de Ilhéus(BA) como fonte de renda para a população através da pesca³⁰.

2.2.Amostragem

Foram realizadas 3 amostragens de peixes da espécie *Mugil Cephalus* (Tainha) em cinco pontos da Baía do Pontal situada no município de Ilhéus no sul da Bahia. A Tabela 1 mostra os meses das coletas e a quantidade de indivíduos coletados em cada ponto de estudo, onde esses foram escolhidos devido ao grau de contaminação pelas atividades antrópicas³¹. Os peixes foram sacrificados mediante a ruptura da coluna vertebral e o fígado e as brânquias foram imediatamente removidos e armazenados a -80 °C durante 3 dias. Posteriormente as amostras foram liofilizadas.

Tabela 1- Meses das amostragens e quantidades de indivíduos da espécie *Mugil Cephalus* em diferentes pontos.

Amostragens			
Pontos	1ª (abril)	2ª(junho)	3ª (novembro)
P1	3	4	-
P2	4	3	5
P3	4	5	4
P4	4	3	4
P5	3	4	4

2.3.Determinação das espécies inorgânicas

Para a digestão das amostras de fígado foram pesados aproximadamente 100 mg em triplicata e adicionado 0,5 mL de ácido nítrico bi-destilado (Vetec, Rio de Janeiro), os tubos foram deixados em overnight, durante 12 h. A mineralização das amostras foi realizada em banho-maria a 100 °C, durante 5 horas³². Após o

resfriamento o volume foi ajustado para 5 mL com água ultrapura. Uma alíquota de 1 mL foi removida e diluída com 10 mL para determinação das espécies inorgânicas por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS (modelo ELAN RDC II, Perkin-Elmer Sciex, Norwalk, CT, EUA). A Tabela 2 apresenta as condições operacionais, o sistema de introdução da amostra consistiu em um nebulizador pneumático com uma câmara de nebulização ciclônica. Durante a análise, o Ródio (^{103}Rh) foi utilizado como padrão interno a uma concentração de 20 mg L^{-1} , para monitorar a estabilidade do plasma. Os elementos analisados foram, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn. A exatidão do método foi avaliada utilizando um material de referência certificado, DORM-3 (material de referência certificado de proteína de peixe, NRCC, Canadá).

Tabela 2- Condições operacionais do ICP-MS

Parâmetros	Valor
Potencia RF	1300 W
Vazão do plasma	15,0 L. min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L. min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,42 L. min ⁻¹
Varredura por leitura	5
Leitura por replicata	3
Tempo de leitura	45 s

2.4. Extração da Metalotioneína

A extração da metalotioneína foi realizada de acordo com o procedimento proposto por ERK³³. Foram pesados aproximadamente 25 mg de amostra e homogeneizadas com um tampão em uma proporção de 1:3 (v/v) contendo Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, Fluoreto de fenil metil sulfonil – PMFS 0,5 mM atuando como um inibidor de protease, e β -mercaptoetanol 0,01 %, como um agente redutor. As amostras foram em seguida centrifugadas a 20.000 rpm durante 60 min a 4 °C e os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e

transferidos para tubos estéreis de 2 mL e aquecida a 70 °C durante 10 min. Uma nova centrifugação nas mesmas condições foi conduzida durante 30 min. Após esta última centrifugação, os sobrenadantes foram separados e congelados a -80 °C até a análise.

2.5. Quantificação da metalotioneína

A quantificação da metalotioneína foi realizada utilizando um método espectrofotométrico descrito por ELLMAN³⁴, onde se utiliza o reagente ácido 5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB para quantificar os grupos tiol presentes nas amostras. O extrato da MT foi tratado com HCl 1 M contendo EDTA 4 mM, NaCl 2 M e DTNB 0,43 mM tamponada com fosfato de sódio 0,2 mM, pH 8,0, onde foram incubadas durante 30 min. A concentração da metalotioneína foi medida utilizando uma absorvância de 412 nm em um leitor de microplacas (Hamilton 190 SpectraMax). Foi utilizado glutatona reduzida (GSH) como um padrão para curva analítica, devido a não disponibilidade do padrão da metalotioneína. O teor de MT foi estimado utilizando 1 mol MT = 20 mols GSH, como descrito por KAGI³⁵.

2.6. Eletroforese unidimensional

Para a corrida eletroforética unidimensional foi realizado a quantificação do teor de proteína total pelo método de Lowry modificado por Peterson utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão³⁶. As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra contendo SDS 10 % (m/v), β -mercaptoetanol 10 mMol L⁻¹, glicerol 10 % (v/v), Tris-HCl 0,2 mol L⁻¹, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,05 % (m/v) na proporção 1:1. A desnaturação da proteína foi realizada submetendo as amostras em água quente durante 5 min. Após a desnaturação as amostras foram aplicadas em géis de 15 %, seguindo o protocolo de LAEMMI³⁷. A corrida ocorreu sob a aplicação de uma corrente de 10 mA durante 15 minutos e depois 34 mA até o final da corrida. Os géis foram corados por coloração com prata³⁸ e digitalizados via ImageScanner II (Amersham). As massas moleculares das bandas de proteínas foram determinadas por meio do padrão Biorad Precision Plus Protein™.

2.7. Análise Multivariada

A técnica multivariada foi aplicada utilizando-se o software Statistica, versão 7.0. A análise de componentes principais PCA foi utilizada para observar a separação dos pontos em relação a coleta com a formação de grupos³⁹.

3.RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1.Avaliação da exatidão do método proposto

Para avaliar a exatidão do método analítico adotado utilizou-se material de referência certificado NRCC (Nacional Research Council Canadá) DORM – 3 (proteína de peixes para metais traços). Os resultados obtidos demonstram uma boa exatidão no procedimento de digestão e determinação dos elementos Cd, Cu, Ni e Pb utilizando ICP-MS, mostrando que não houve diferença significativa entre os valores certificados e encontrados com um nível de confiança de 95 %. A Tabela 3 mostra as concentrações certificada e encontrada do material de referência.

Tabela 3- Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) no material de referência certificado.

Elementos	DORM- 3	
	Certificado	Encontrado
Ni	1,28 \pm 0,24	1,22 \pm 0,06
Cd	0,29 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03
Cu	15,5 \pm 0,63	15,0 \pm 4,87
Pb	0,39 \pm 0,06	0,35 \pm 0,03

3.2. Determinação da concentração de espécies inorgânicas na espécie de peixe *Mugil cephalus* (Tainha)

Foram determinados a concentração de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn nas amostras de fígado, utilizando ICP-MS. A tabela 4 apresenta os valores de concentração da Amostragem 1 nos 5 pontos, sendo A1P1 – Rio Salgado, A1P2 - Rio Cachoeira, A1P3 – Rio Itacanoeira, A1P4 e A1P5 - Baía do Pontal.

Tabela 4- Concentrações da primeira amostragem de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em 5 pontos.

Elementos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
	amostragem/ponto				
	A1P1	A1P2	A1P3	A1P4	A1P5
Ag	3,31 \pm 0,27	4,58 \pm 0,27	4,62 \pm 0,01	4,42 \pm 0,19	3,50 \pm 0,25
As	1,79 \pm 0,14	1,47 \pm 0,15	2,21 \pm 0,22	1,75 \pm 0,13	1,87 \pm 0,25
Cd	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,09 \pm 0,11	0,06 \pm 0,07
Co	0,72 \pm 0,05	0,62 \pm 0,07	0,66 \pm 0,08	0,62 \pm 0,04	0,84 \pm 0,04
Cr	1,02 \pm 0,11	0,95 \pm 0,11	1,03 \pm 0,16	1,99 \pm 0,14	1,34 \pm 0,13
Cu	187,6 \pm 28,9	174,6 \pm 35,2	199,2 \pm 21,2	169,2 \pm 21,2	156,7 \pm 53,8
Fe	678,2 \pm 173,9	804,6 \pm 207,1	809,1 \pm 203	449,4 \pm 122,6	373,3 \pm 78,1
Ni	0,58 \pm 0,08	0,47 \pm 0,05	0,69 \pm 0,04	0,60 \pm 0,05	0,58 \pm 0,04
Pb	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Zn	11,2 \pm 1,24	10,6 \pm 1,76	11,7 \pm 2,78	7,02 \pm 1,19	9,11 \pm 1,54

Os resultados da Tabela 4 mostram que entre os metais essenciais o cobre apresentou concentrações maiores 199,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ que o ministério da saúde no decreto 55871/65 estabelece de (30 $\mu\text{g g}^{-1}$) conforme a tabela 6. O As, Cd e Cr apresentaram concentrações maiores 2,21, 0,14 e 1,99 $\mu\text{g.g}^{-1}$ respectivamente que o estabelecido pelo ministério de saúde na Resolução – RDC nº 42/13, apresentado na Tabela 6. As maiores concentrações de As, Cd e Cu foi encontrada no ponto 3, Rio Itacanoeira, e no ponto 4 e 5, Baía do Pontal apresentaram maiores concentração de Cr, indicando uma possível contaminação desses elementos, devido as atividades antrópicas.

A tabela 5 apresenta os valores de concentração da amostragem 2 nos 5 pontos, sendo A2P1 – Rio Salgado, A2P2 - Rio Cachoeira, A2P3 – Rio Itacanoeira, A2P4 e A2P5 - Baía do Pontal.

Tabela 5- Concentrações da segunda amostragem de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em 5 pontos.

Elementos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
	amostragem/ponto				
	A2P1	A2P2	A2P3	A2P4	A2P5
Ag	4,35 \pm 0,25	2,32 \pm 0,22	2,25 \pm 0,10	8,15 \pm 0,45	5,29 \pm 0,22
As	1,40 \pm 0,08	4,42 \pm 0,35	1,39 \pm 0,06	1,28 \pm 0,09	1,16 \pm 0,13
Cd	0,16 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	0,05 \pm 0,005	0,13 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02
Co	0,51 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	0,39 \pm 0,02	0,44 \pm 0,05	0,94 \pm 0,09
Cr	0,96 \pm 0,09	0,86 \pm 0,05	0,84 \pm 0,08	1,05 \pm 0,16	0,77 \pm 0,08
Cu	82,9 \pm 18,8	49,4 \pm 9,4	123 \pm 14,3	57,3 \pm 7,9	60,7 \pm 10,8
Fe	280 \pm 67,7	732 \pm 137	325 \pm 63	447 \pm 91	298 \pm 48
Ni	0,34 \pm 0,04	0,43 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,45 \pm 0,01	0,47 \pm 0,04
Pb	0,05 \pm 0,005	0,10 \pm 0,01	0,04 \pm 0,007	0,06 \pm 0,005	0,35 \pm 0,04
Zn	7,75 \pm 1,81	14,4 \pm 1,53	7,78 \pm 1,26	7,89 \pm 1,27	7,64 \pm 1,42

A tabela 5 apresenta as concentrações das espécies inorgânicas, o qual o cobre apresentou concentrações maiores em relação aos metais essenciais. E o As, Cd, Cr e Pb apresentaram concentrações maiores que o permitido pelo Ministério da Saúde, conforme a tabela 6. Os elementos Ag, Co, Cu, Fe e Zn de acordo com OLMEDO⁴¹ são considerados metais essenciais, pois possuem função no organismo, mas em concentrações altas causam sérios problemas. Entretanto o As, Cd, Cr, Ni e Pb são considerados elementos tóxicos e não apresentam funções nos organismos⁴². De acordo com as tabelas 4 e 5 entre os metais essenciais, o cobre apresentou uma concentração de 6 vezes maior que o limite máximo permitido de acordo com DECRETO 55871/65 pelo Ministério da Saúde, essa concentração foi encontrada na primeira amostragem (abril) no ponto 3 (Rio Itacanoeira), indicando um nível de contaminação elevado, na segunda amostragem o ponto 3 continuou apresentando uma maior concentração de cobre, de acordo com VIANA⁴² a espécie *Mugil Cephalus* apresentou concentração de Cu (159,5 $\mu\text{g g}^{-1}$), cerca de 5 vezes maior que o limite máximo permitido (30,0 $\mu\text{g g}^{-1}$) e ATLI e CANLI⁴³ encontrou

na espécie *Oreochromis niloticus* concentração de Cu ($169,2 \pm 35,6$), esses valores podem estar relacionados pela atividade de urbanização, lançamentos de efluentes domésticos e industriais nos locais de estudo. SANCHES FILHO⁵ afirma que a espécie *Mugil* são peixes planctívoro e alimenta-se de plâncton e não deveria apresentar altas concentrações de espécies inorgânicas, pois se classifica no menor nível trófico da cadeia alimentar. As altas concentrações indicam uma possível contaminação em vários pontos desse local. De acordo com VIANA²² os metais são bioacumulados por fitoplâncton e, conseqüentemente, por organismos marinhos de menor cadeia trófica.

A alta concentração dos metais está relacionada com a crescente densidade populacional e o desenvolvimento urbano, onde tem um potencial de afetar negativamente os ecossistemas aquáticos locais⁴⁴, gerando uma série de impactos, dentre eles a bioacumulação dos metais⁴⁵.

A Tabela 6 mostra os limites máximos das espécies inorgânicas permitidos em amostras de alimentos, fixados pelo Ministério da Saúde através da Portaria 685/98, Resolução RDC nº 42/13 e o Decreto 55871/65.

Tabela 6 – Limites máximos de espécies inorgânicas permitido em alimentos ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) estabelecido pelo ministério de saúde na Portaria 685/98, Resolução – RDC Nº 42/13 e Decreto 55871/65.

Espécies inorgânicas	Legislação	Limite ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Zinco	Portaria 685/98	50
Cádmio	Resolução - RDC No 42/13	0,10
Cobre	Decreto 55871/65	30
Níquel	Decreto 55871/65	5
Cromo	Decreto 55871/65	0,10
Chumbo	Resolução - RDC No 42/13	0,30
Arsênio	Resolução - RDC No 42/13	1

A tainha apresentou valores de concentrações de As, Cd, Cr, Cu e Pb acima do permitido pela legislação brasileira, (tabela 6) podendo afirmar que estão impróprios para consumo humano, uma vez que seu consumo pode

ocasionar doenças relativas à ingestão desses metais⁴⁶. De acordo com LABARRÈRE⁴⁷ a concentração de metais nos peixes será maior em locais contaminados, principalmente em áreas de grande atividade industrial, evidenciando as ações antropogênicas da humanidade.

O tecido utilizado para avaliar o estágio de contaminação das amostras de peixes foi o fígado, pois é um órgão de desintoxicação e armazenamento de metais tóxicos, o qual é utilizado para investigação da toxicidade ambiental⁴⁸ pois acumulam maiores quantidades de metais no organismo¹⁵.

3.3. Análise de componentes principais

A Figura 2 representa o gráfico de pesos, mostrando que em PC1 foi possível separar as variáveis Cd, Ag, Cu e Pb com pesos negativos e as variáveis Cr, Co, Ni, As, Zn e Fe com peso positivo. Em PC2, foi possível separar Cd, Ag, Cu, Pb.

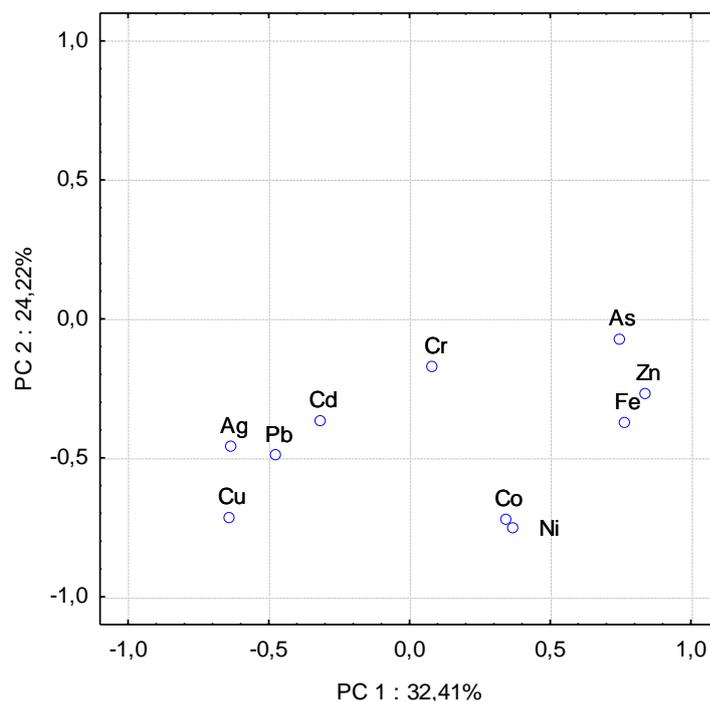


Figura 2 - Gráfico que representa a relação entre os dois fatores (PC1 e PC2) e as variáveis estudadas.

A Figura 3 representa o gráfico gerado pela análise dos componentes principais das amostras de peixes e os seus respectivos códigos, no qual é possível observar a formação de grupos.

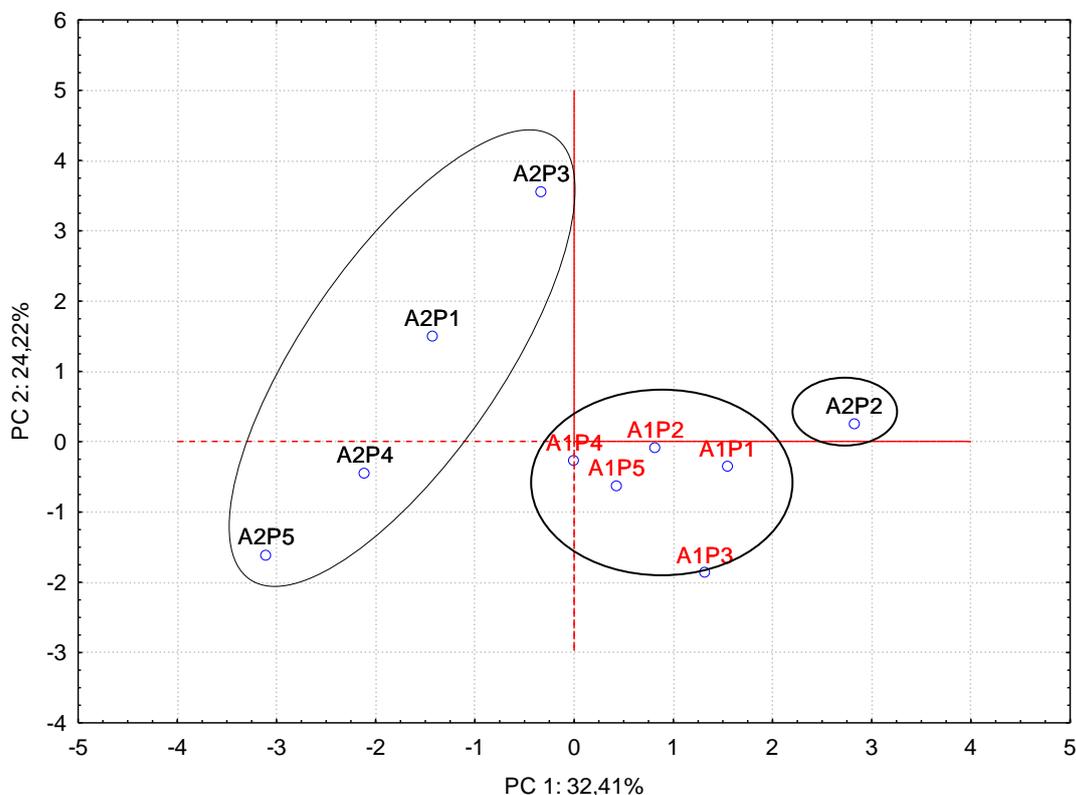


Figura 3 - Gráfico de “escores” PC1 x PC2 para os elementos com as variáveis estudadas. A1- amostragem 1, A2- amostragem 2 e os pontos indicando o local da amostragem. A1P1 e A2P1 – Rio Salgado, A1P2 e A2P2 – Rio Cachoeira, A1P3 e A2P3 – Rio Itacanoeira e A1P4 e A2P5, A1P5 e A2P5 - Baía do Pontal.

A análise do gráfico de escores permite afirmar que houve uma separação das amostras por amostragem. Uma comparação das figuras 2 e 3 mostra que a amostragem 1 apresenta uma maior concentração do Cr, Co, Ni, As, Zn e Fe em todos os pontos, onde a separação é explicada pela PC1. Já a amostragem 2 os pontos 4 e 5 apresentam uma concentração maior do Cd, Pb, Ag e Cu, onde é explicada pela PC2. No entanto, na amostragem 2 os pontos 1 e 3 apresentam concentrações menores de Cd, Pb, Ag e Cu, os pontos 4 e 5 apresentaram concentrações maiores de Pb, Ag e Cu. O ponto 2 teve um comportamento diferentes em relação aos outros pontos da mesma coleta,

sendo explicada pela PC1, apresentando maiores concentrações de Cr, Co, Ni, As, Zn e Fe. Esse comportamento diferente no ponto 2, Rio Cachoeira pode estar relacionada com o despejo de efluente domésticos e as atividades agrícolas no local. A análise dos gráficos de pesos e escores mostra que as duas componentes explicam 56,63 % da variância.

3.4. Quantificação de Metalotioneína total

A quantificação da metalotioneína total foi realizada por espectrofotometria na região do visível através da reação de Ellman onde utiliza ácido 5,5'- ditiobis - (2 - nitrobenzóico) - DTNB para quantificar a concentração de grupos tiol presentes na amostra. Essa reação é específica para quantificar proteínas ricas em grupos cisteína³⁴. A MT apresenta em sua estrutura 30 % de cisteína¹⁵, onde os grupos tiol se ligam aos metais¹⁷.

A Figura 4 apresenta a concentração de metalotioneína em amostra de fígado em 5 pontos diferentes da Baía do Pontal. As amostras dos pontos P1- Rio Santana, P2- Rio Cachoeira e P3- Rio Itacanoeira, apresentaram concentração de metalotioneína maiores em relação aos pontos P4 e P5 na Baía do Pontal.

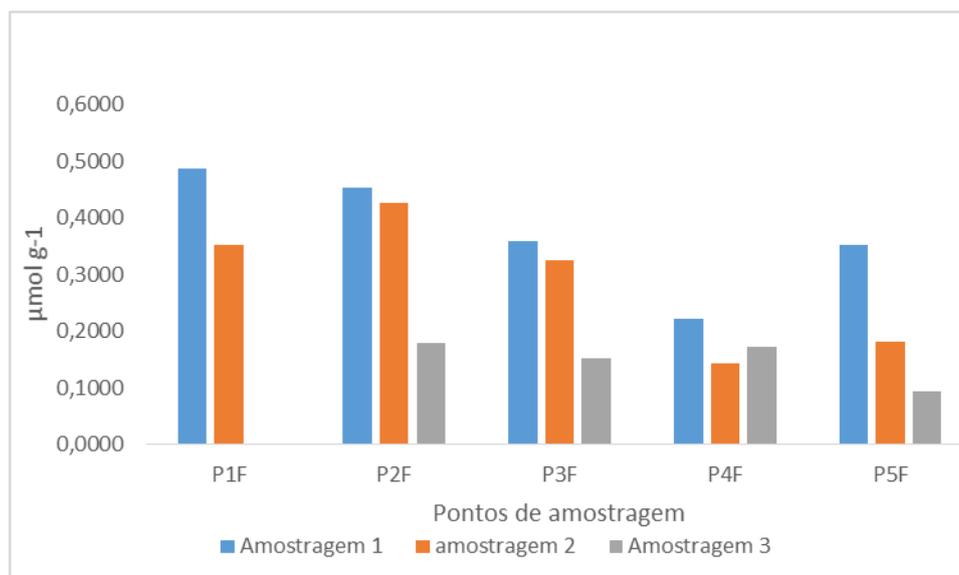


Figura 4- Quantificação de metalotioneína total em amostra de fígado na espécie *Mugil Cephalus*. P1- Rio Santana, P2- Rio Cachoeira, P3- Rio Itacanoeira e P4 e P5- Baía do Pontal.

Segundo ATLI e CANLI⁴³, o acúmulo de metais nos tecidos dos peixes ocorre em relação à contaminação ambiental. Com isso, a utilização de biomarcadores para avaliar os efeitos biológicos da exposição a metais⁴⁹ em situações de contaminação ambiental vem aumentando, especificamente devido à relação direta entre os níveis de metais presentes no meio ambiente e as concentrações encontradas nos tecidos dos animais aquáticos^{14,50}.

A Figura 5 apresenta a concentração de metalotioneína em amostra de brânquia em 5 pontos diferentes da Baía do Pontal. Pode-se observar que as amostras dos pontos P2-Rio Cacheira e P3 –Rio Itacanoeira, apresentaram maiores concentrações na primeira amostragem.

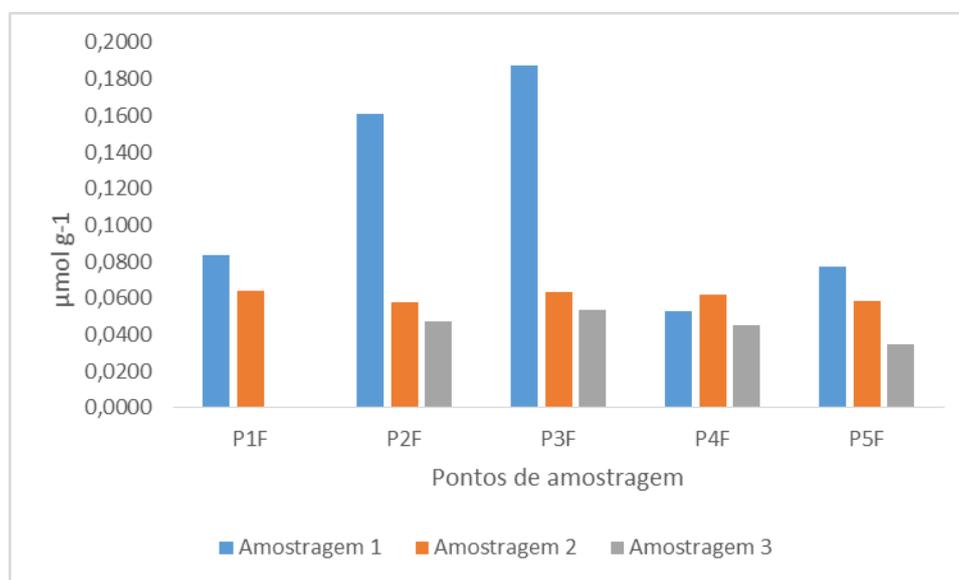


Figura 5- Quantificação de metalotioneína total em amostra de brânquias na espécie *Mugil Cephalus*. P1- Rio Santana, P2- Rio Cachoeira, P3- Rio Itacanoeira e P4 e P5- Baía do Pontal.

As concentrações de metalotioneína em fígado obtiveram valores maiores em relação às brânquias. Isso acontece porque é um órgão de armazenamento e desintoxicação de metais tóxicos no corpo⁴⁷, seguido pelas brânquias que é o primeiro órgão em contato com os poluentes nas águas. Geralmente se utiliza o fígado²¹, brânquias⁵⁰, rins¹¹, bÍlis⁴⁹ e músculos¹⁹ para avaliar a contaminação aquática¹⁴. Segundo NAJI²¹, as concentrações de metalotioneína foram maiores no fígado em relação as brânquias utilizando a

tilápia *Oreochromis mossambicus* como um bioindicador de poluição ambiental, confirmando que o fígado é um bom órgão de desintoxicação de metais.

3.5 Eletroforese Unidimensional

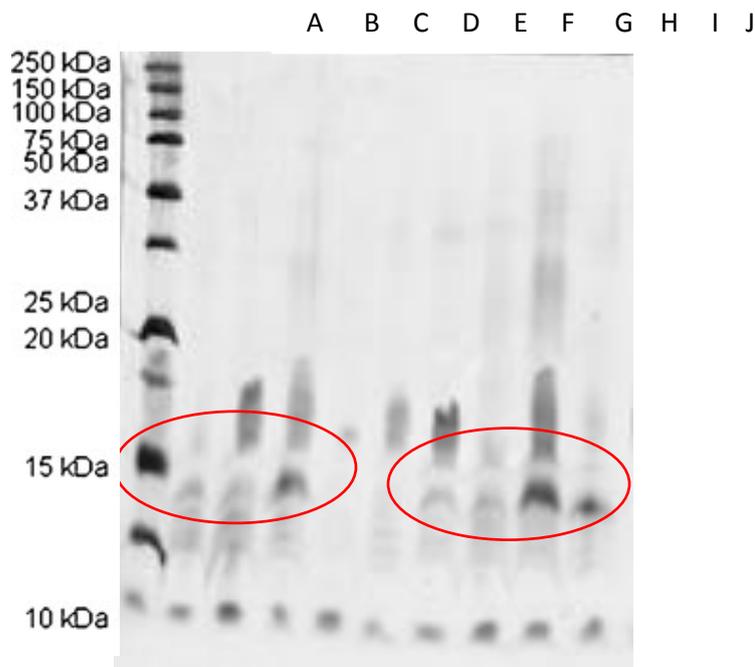


Figura 6- Eletroforese unidimensional- bandas de metalotioneína na faixa de 14 kDa (faixa B-J) após a purificação da amostra com tratamento térmico. A faixa A mostra o padrão de peso molecular.

Após o processo de purificação com tratamento térmico foi determinado o teor de proteína total das amostras pelo método de Lowry para a identificação das bandas da metalotioneína. De acordo com a figura 6 pode-se observar que houve o aparecimento das bandas na faixa de 14 kDa característica da metalotioneína, que pode apresentar-se em forma de dímero⁴⁹. HAUSER-DAVIS¹⁵ analisando géis unidimensional em amostras de tilápia observou o aparecimento das bandas da metalotioneína na faixa de 14 kDa. O intuito da análise de eletroforese foi observar o aparecimento da banda da metalotioneína.

4. CONCLUSÃO

Foram encontradas altas concentrações de cobre nas amostras de fígado de peixes, no qual a amostragem 1 apresentou concentrações de cerca de 6 vezes maiores que o limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde de 30 $\mu\text{g g}^{-1}$. Nas duas amostragens o cobre apresentou altas concentrações no ponto 3, Rio Itacanoeira indicando um grau de contaminação no local, devido os lançamentos de efluentes e atividades agrícolas. O As, Cd e Cr apresentaram altas concentrações em relação ao limite máximo permitido pelo Ministério de Saúde. A espécie estudada *Mugil Cephalus* apresentou concentrações altas desses elementos, o qual não era esperado visto que essa espécie se classifica na menor cadeia trófica e alimenta-se de plâncton. As altas concentrações encontradas indicam uma possível contaminação na área de estudo.

Em relação as análises de componentes principais podem –se perceber que houver a formação de grupos, onde a amostragem 1 foi separada pela PC1 e a amostragem 2 pela PC2, um ponto da amostragem 2 obteve um comportamento diferente dos outros pontos, sendo separado pela PC1, esse ponto é indicado pelo Rio Cachoeira, e esse comportamento pode estar relacionado com alto nível de lançamentos de esgotos domésticos, indicando uma alta concentrações de As, Co, Cr, Fe, Ni e Zn.

A determinação da metalotioneína foi realizada para avaliar a contaminação ambiental. Onde as amostras de fígado alcançaram maiores concentrações em relação as brânquias, isso já era esperado visto que é um órgão de armazenamento e desintoxicação.

5. REFERENCIAS

1. LUO, L; KE, C; GUO, X; SHI, B; HUANG, M. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. **Fish & Shellfish Immunology**. V. 38, p. 318-329, 2014.
2. CEUTA, L.O; BOEHS, G. Reproductive cycle of *Tagelus plebeius* (Mollusca: Bivalvia) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, V. 72, N. 3, p. 569-576, 2012.
3. MARTINS, P. T. A; WANDERLEY, L. L. Dinâmica de ocupação espacial de áreas contíguas (período 1987-2008) e sua relação com tensores de origem antrópica no manguezal do rio cachoeira, Ilhéus, Bahia. **Sociedade e Natureza**, V. 21. N. 2, p. 77-89, 2009.
4. KEHRIG, H.A; FERNANDES, K.W.G; MALM, O; SEIXAS, T.G; DI BENEDITO, A.P.M; DE SOUZA, C.M.M. Transferência trófica de mercúrio e selênio na costa norte do rio de janeiro. **Química Nova**. V. 32, N. 7, p. 1822-1828, 2009
- 5.SANCHES FILHO, P. J; FONSECA, V. K. da ; HOLBIG, L. Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. **Ecotoxicology Environmental Contamination**, V. 8. N. 1, p. 105-111, 2013.
- 6.MOREAU, A.M.S.S; HORA, J.B; AMORIM, R.R; KER, J.C; GOMES, F.H; MOREAU, M.S. Uso e ocupação dos Manguezais da área urbana de Ilhéus: Uma abordagem histórica e socioambiental. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, V. 8. N. 2, 2010.
- 7.RAHMANPOUR, S; GHORGHANI, N.F; ASHTIYANI, S.M.L. Heavy metal in water and aquatic organisms from diferente intertidal ecosystems, Persian Gulf. **Environmental Monitoring and Assessment**. V. 186, p. 5401-5409, 2014.
- 8.YILMAZ, A. B. Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. **Environmental Research**, V. 92. N. 3, p. 277-281, 2003.

- 9.SOUZA, G. R; GARCEZ, M. A. P; SANTOS, V. C. G; SILVA, D. B; CAETANO, J; DRAGUNSKI, D. C. Quantificação de metais pesados em peixes de um pesqueiro localizado na cidade de Umuarama - Pr. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia da Unipar**, V. 12, N. 1, p. 61-66, 2009.
- 10.WANICK, R.C; FREIRE, A. S; COUTINHO, C. C; SANTELLI, R. E. Metallothioneins and metallothionein-like proteins as biomarkers of environmental contamination: Techniques for extraction, separation and quantification – a review. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**. V. 1. N. 4, 2011.
- 11.INFANTE, H.G; CAMPENHOUT, K.V; BLUST, R; ADAMS, F.C. Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution. **Journal of Chromatography A**, 1121, p. 184-190, 2006.
12. PAULINO, M. G; BENZE, T. P; SADAUSKAS-HENRIQUE, H; SAKARAGUIA, M. M; FERNANDES, J. B; FERNANDES, M. N. The impact of organochlorines and metals on wildfish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. **Science of the Total Environment**. 497–498, p. 293–306, 2014
- 13.LADHAR-CHAABOUNI, R; MACHREKI-AJMI, M; HAMZA-CHAFFAI, A. Use of metallothioneins as biomarkes for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). **Environmental Monitoring and Assessment**. V. 184, p. 2177-2192, 2012.
- 14.TENÓRIO-DAUSSAT, C.L; RESENDE, M.C.M; ZIOLLI, R; HAUSER-DAVIS, R.A; SCHAUMLOFFEL, D; SAINT´PIERRE, T.D. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. **Talanta**. V 120. p. 491-497, 2014.
- 15.HAUSER-DAVIS, R.A; GONÇALVES, R.A; ZIOLI, R.L; CAMPOS, R.C.DE. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis,

spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**. V. 116-177. P. 54-60, 2012.

16. FREIRE, M.M; SANTOS, V.G; GINUINO, I.S.F; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**,V. 12, N. 3, p. 347-354, 2008.

17. MAO, H; WANG, Da-H; YANG, W. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. **Aquatic Toxicology** 110– 111 2012.

18. GAGNÉ, F; SMYTH, S. A; ANDRÉ, C; DOUVILLE, M; GÉLINAS, M; BARCLAY, K. Stress-related gene expression changes in rainbow trout hepatocytes exposed to various municipal wastewater treatment influents and effluents. *Environmental Science and Pollution Research*. V. 20, p. 1706–1718, 2013.

19. LAVRADAS, R.T; HAUSER-DAVIS, R.A; LAVANDIER, R.C; ROCHA, R.C.C; SAINT´PIERRE, T.D; SEIXAS, T; KEHRIG, H.A; MOREIRA, I. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes sp.*) specimens from southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 107, p. 55-60, 2014.

20. OURIVES, T.M; RIZZO, A.E; BOEHS, G. Composition and spatial distribution of the benthic macrofauna in the Cachoeira River estuary, Ilhéus, Bahia, Brazil. **Journal of Marine Biology and Oceanography**, V. 46, N. 1, p. 17-25, 2011.

21. NAJI, A; ISMAIL, A; KAMRANI, E; SOHRABI, T. Correlation of MT Levels in Livers and Gills with Heavy Metals in Wild Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from the Klang River, Malaysia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. V. 92, p. 674–679, 2014.

22. VIANA, Z.C.V; DA SILVA, E.; FERNANDES, G.B; SANTOS, V.L.C.S. Composição centesimal em músculo de peixes no litoral do estado da Bahia/ Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. V. 12, N. 2, p.157-162, 2013.

23. CARROLA, J; SANTOS, N; ROCHA, M.J; FONTAINHAS-FERNANDES, A; PARDAL, M.A; MONTEIRO, R.A.F; ROCHA, E. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**. V. 21, p. 6057–6068, 2014.
24. PEREIRA, P; RAIMUNDO, J; CANÁRIO, J; ALMEIDA, A; PACHECO, M. Looking at the aquatic contamination through fish eyes – A faithful picture based on metals burden. **Marine Pollution Bulletin**. V. 77, p. 375-379, 2013
25. MILINKOVITCH, T; IMBERT, N; SANCHEZ, W; LE FLOCH, S; THOMAS-GUVON, H. Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: Biomarkers in the heart of the juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 88, p. 1-8, 2013.
26. FERREIRA, M; FERREIRA-MORADAS, P; HENRIQUES-REIS, M.A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. **Aquatic Toxicology**, V. 71. N. 1, p. 39-49, 2005.
27. SHEN, K; JAMANDRE, B.W; HSU, C; TZENG, W; DURAND, J. Plio-Pleistocene sea level and temperature fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally-distributed flathead mullet *Mugil cephalus*. **BMC Evolutionary Biology**. V. 11, p. 1-17, 2011.
28. PINTO, T.R; BOEHS, G. Nematopsis sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis*(Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da Região Estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, V. 45, N. 2, p. 95-100, 2008.
29. NACIF, P. G. S.; COSTA L. M.; SAADI A.; FERNANDES-FILHO E. I.; KER J. C.; COSTA O. V.; MOREAU M. S. Ambientes naturais da bacia hidrográfica do Rio Cachoeira. **Artigo extraído da Tese (Doutorado no Departamento de Solos)**. UFV, Viçosa MG. 2003.
30. SANDE, D; MELO, T.A; OLIVEIRA, G.S.A; BARRETO, L; TALBOT, T; BOEHS, G; ANDRIOLO, J. L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da

poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, V. 47, N. 3, p. 190-196, 2010.

31. HOUDE, M; GIRAUDDO, M; DOUVILLE, M; BOUGAS, B; DE SILVA, A. O; SPENCER, C; LAIR, S; VERREAULT, J; BERNATCHEZ, L; GAGNON, C. A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Percaflavescens*). **Science of the Total Environment**. 497–498, p. 307–318, 2014.

32. BALCERZAK, M. Sample digestion methods for the determination of traces of precious metals by spectrometric techniques. **Analytical sciences**. V. 18, p. 737–750, 2002.

33. ERK, M., IVANKOVI, D., RASPOR, B., PAVICIC, J. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**. V. 57, p. 1211–1218, 2002.

34. ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V.82, p. 70–77, 1959.

35. KAGI, J.H.R. Overview of metallothionein. In: Rierdan, J.F., Vallee, B.L. (Eds.), *Methods of Enzymology: Metallobiochemistry: Metallothionein and Related Molecules*. **Academic Press**, San Diego, pp. 613–626, 1991.

36. PETERSON, G.L. Review of the foline phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**. V. 100, p. 201–220, 1979.

37. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**. V. 7, p.227:680, 1970.

38. HEUKESHOVEN, J; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**. V.6, p. 103-112, 1985.

39. SABIN, J.G; FERRÃO, M.F; FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 40, N. 3, p. 387-396, 2004.

41. OLMEDO, P; HERNÁNDEZ, A.F; PLA, A; FEMIA, P; NAVAS-ACIEN, A; GIL, F. Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury–selenium balance. **Food and Chemical Toxicology**. V. 62, p. 299–307, 2013.
42. VIANA, Z.C.V; DA SIVA, E; FERNANDES, G.B; KORN, M.G.A; SANTOS, V.L.C.S. Estudo da absorção de elementos químicos no músculo de peixes do litoral da Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. V.11, N.1, p.27-34, 2012.
43. ATLI, G; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 25, p. 33-38, 2008.
44. MIERZEJEWSKI, J; HANEY, D. C; HURK, P. V. D. Biomarker responses in sunfish species and largemouth bass from the Saluda River, South Carolina. **Ecotoxicology and Environmental Safety** . V. 110, p. 8–15, 2014.g
45. GOMES, M.V.T & SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de três marias, Minas Gerais, Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**. V.6, N.1, p.24-30, 2011.
46. CHEN, W; LIAO, C. Interpreting copper bioaccumulation dynamics in tilapia using systems-level explorations of pulsed acute/chronic exposures. **Ecotoxicology**. V. 23, p. 1124–1136, 2014.
47. LABARRÈRE, C.R; MENEZES, B.D; MELO, M.M. Avaliação dos teores de zinco em brânquias, carcaça, fígado e musculatura de diferentes espécie de peixes capturados no rio São Francisco (MG, BRASIL). **Geonomos**. V. 20, N. 1, p. 86-91, 2012.
48. FILHO, F.M.S; REZENDE, K.F.O; EMERENCIANO, A.K; MOREIRA, L.M; VILA, V.B; BORGES, R.M; PRESSINOTTI, L.N. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de saúde ambiental**. V.2 , N.1 , p. 1-22, 2014.
49. HAUSER-DAVIS, R.A; BASTOS, F.F; TUTON, B; ROCHA, R.C; SAINT' PIERRE, T; ZIOLLI, R.L; ARRUDA, M.A.Z. Bile and liver metallothionein

behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. V. 28, p. 70-74,2014.

50.CAMPENHOUT, K.V; INFANTE, H.G; HOFF, P.T; MOENS, L; GOEMANS, G; BELPAIRE, C; ADAMS, F; BLUST, R; BERVOETS, L. Cytosolic distribution of Cd, Cu and Zn, and metallothionein levels in relation to physiological changes in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) metal affected habitats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 73, N 3, p. 296-305, 2010.