

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

TATIANA CRISTINA SENRA MOTTA

**Metalotioneínas em Tilápias (*Oreochromis niloticus*),
(Linnaeus, 1758): dinâmica de formação e desintoxicação avaliada
através de bioensaios com o emprego de marcadores isotópicos de
 ^{111}Cd e ^{65}Cu**

**Piracicaba
2013**

TATIANA CRISTINA SENRA MOTTA

**Metalotioneínas em Tilápias *Oreochromis niloticus*,
(Linnaeus, 1758): dinâmica de formação e desintoxicação avaliada
através de bioensaios com o emprego de marcadores isotópicos de
 ^{111}Cd e ^{65}Cu**

Versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
da Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ferreira

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Motta, Tatiana Cristina Senra

Metalotioneínas em Tilápias *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus 1758): dinâmica de formação e desintoxicação avaliada através de bioensaios com o emprego de marcadores isotópicos de ^{111}Cd e ^{65}Cu / Tatiana Cristina Senra Motta; orientador José Roberto Ferreira. - - versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

134 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biomarcadores 2. Cádmio 3. Cobre 4. Ictiologia 5. Metais pesados
6. Toxicologia ambiental I. Título

CDU 504.5 : 577.122

À meu marido Sílvio Pires Mariano pela constante presença, apoio e

carinho

Dedico

Aos meus filhos Caian Senra Fernandez e Flora Senra Mariano, com

todo meu amor e muito carinho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. José Roberto Ferreira por me receber com carinho, ter tido paciência durante todo o tempo de convívio no doutorado e principalmente pela sabedoria de suas palavras amigas.

À Dr^a Maria Fernanda Georgina Giné Rosias pela credibilidade, incentivo e contribuição na ideia do projeto.

Às técnicas e amigas Aparecida de Fátima Patreze e Myriam Raquel Orsi pelo companheirismo, momentos agradáveis, incentivo e pelo auxílio em toda a parte laboratorial

Ao Dr. Amauri pela amizade, sugestões, credibilidade e por ceder o espaço e equipamentos sempre que necessário durante a pesquisa.

Ao Dr. Emanuel Carrilo pela cessão de espaço e equipamentos em seu laboratório.

À minha amiga Fabiana Ribau e seu companheiro Paulo que me receberam com muito carinho durante meu estágio em São Carlos.

Ao Dr. Carlos Alberto Labate e Mônica Labate por ter aberto o laboratório, pelo apoio e confiança.

A toda equipe do laboratório Marx Ferrer da ESALQ, em especial a Dr^a Simone e Dr^a Sônia pela ajuda incondicional durante toda minha permanência por lá.

Ao Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira pela cessão de espaço e equipamentos em seu laboratório durante todo o meu doutorado.

A todos do Laboratório de Melhoramento Vegetal do CENA/USP pela convivência agradável.

Ao Dr. Renato Ferreira e Dr^a Lorena pela amizade e pelas sugestões científicas.

À Dra Marli Fiori, Dra Tsai pelo apoio disponibilizando equipamentos, reagentes, estrutura e tudo mais que foi necessário durante esta jornada.

Ao Dr. Alfredo pelo apoio logístico e pela ponte entre Rio Claro e Piracicaba sempre muito providencial.

À toda equipe do CENA/USP como os professores, os técnicos, os funcionários e colegas pelas conversas no café, nos corredores, auxílio nos trabalhos laboratoriais e pela força sempre.

Às amigas Alessandra, Andréa, Tuane, Lidiane, Iracema pelas boas risadas, conselhos e carinho durante toda minha estada no CENA.

A todas as professoras do CECIN que cuidaram com tanto carinho da minha pequena Flora.

À minha querida amiga Andréa Pereira e sua família Lúcia e João Brasil e agora o pequeno Rafael, sempre acolhedores e atenciosos. Estes estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, apoiando, incentivando e acreditando em mim.

Ao meu marido Sílvio Pires Mariano pelo carinho, pela ajuda em casa se desdobrando em dois para cuidar do Caian e da Flora, botar ordem na casa e ainda fazer aquela comidinha gostosa que só ele sabe.

A todos que me apoiaram de perto e de longe, minha família em BH, minha irmã querida, meu cunhado, minha mãe, meus sobrinhos, todos que tiveram muita paciência nas minhas crises de saudades e vieram passear por aqui e me dar forças para seguir até o fim, obrigada.

*“A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total
é a plena vitória”.*

Mohandas Karamchand Gandhi (Mahatma Gandhi)

RESUMO

MOTTA, T. C. S. **Metalotioneínas em Tilápias *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus 1758)**: dinâmica de formação e desintoxicação avaliada através de bioensaios com o emprego de marcadores isotópicos de ^{111}Cd e ^{65}Cu . 2012. 134 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Este trabalho apresenta a pesquisa de interação de organismos aquáticos com metais, especificamente cobre e cádmio assim como da combinação deles. Para tanto, descreve-se um protocolo baseado em ensaios de toxicidade com tilápias *Oreochromis niloticus*, desenvolvido com a finalidade de estabelecer a concentração letal 50 (CL_{50}) 96h. Como recurso adicional, focando a translocação de metais, foram utilizadas soluções enriquecidas isotopicamente de ^{65}Cu (99,7%) e ^{111}Cd (95,5%), as quais foram aplicadas através de injeções intraperitoneais. As concentrações dos metais nos tecidos e nas frações citosólicas do fígado, brânquias e músculo foram determinadas a partir dos extratos preparados em solução tampão tris-HCl 50 mmolL^{-1} , agentes redutores e antiproteolíticos, na proporção 3:1 (m/v). Adicionalmente, foram determinados os teores de proteínas totais seguidos da etapa de isolamento das metalotioneínas. As concentrações letais (CL_{50}) 96h calculadas pelo método Trimmed Spearman-Kärber (95% de confiança), foram iguais a 20,13, 3,53 e 1,36 mg L^{-1} para cádmio, cobre e cobre+cádmio respectivamente. Estes valores indicam uma significativa diferença na sensibilidade dos organismos aos diferentes tratamentos. Observou-se uma redução na bioconcentração dos metais em função da concentração do metal e do tecido analisado, esta é maior para o Cu do que para o Cd e menor para o músculo em relação a brânquia e ao fígado. Os teores de proteínas totais nos tecidos foram determinados e os valores encontrados estiveram entre 3,25 mg/mL para fígados e 11,83 mg/mL para músculo. A presença de MTs nos diferentes tecidos e respectivos tratamentos, foi pesquisada empregando-se eletroforese capilar e separação de proteínas utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida. Por ambas as técnicas eletroforéticas foi possível identificar as metalotioneínas. Contudo, as análises dos extratos dos tecidos por espectrometria de massas, MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization) e ESI-MS (electrospray tandem mass spectrometry) não mostraram-se adequadas para identificação de metalotioneínas.

Palavras-chave: Tilápias. Cádmio. Cobre. Metalotioneínas. Toxicidade. Injeção intraperitoneal.

ABSTRACT

MOTTA, T. C. S. **Metallothionein in tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758)**: dynamic of formation and detoxification evaluated by bioassays with the use of isotopic tracers ^{111}Cd and ^{65}Cu . 2012. 134 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

This paper discuss the interactions of Cd, Cu and it mixture upon aquatic organisms. To reach for these goals lethal 50 (LC₅₀) acute toxicity 96h assays were carried out. In order to assess for the metals translocation in fish, isotopically enriched solutions of ^{65}Cu (99,7%) and ^{111}Cd (95,5%), were used, through an intra-peritoneal injections. Metals concentrations in tissue and in the citossolic fractions of liver, and muscular tissue were analysed in the 50 mmol⁻¹ tris-HCl buffer solutions, reducing and un-proteolitic (3:1) solutions. In addition the total protein content were determinate, followed by the metalothionein isolation. Lethal concentrations were calculated by the Spearman-Kärber method at 95% confidence interval, as 20.13, 3.53 and 1.36 mgL⁻¹ for Cd, Cu and Cd+Cu respectively, which denote differences in organisms sensitivity according to the treatment. Metal bio-concentration was reduced depending on the analyte concentration and kind of tissue, being higher to Cu than to Cd. Total protein concentration varied from 3.35 mg L⁻¹ for liver to 11.83 mg L⁻¹ in the muscular tissue. The occurrence of MTs in tissues and in all treatments were investigated by using both, capillary electrophoresis and gel of polyacrilamide. In all situations the occurrence and identification of Mts were verified, but even with MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization) and ESI-MS (electrospray tandem mass spectrometry), or actual instrumental facilities no satisfactory results were obtained, being not possible the identification of MTs in the analysed samples.

Keywords: Tilapia. $^{111}\text{Cadmium}$. $^{65}\text{Copper}$. Metallothioneins. Toxicity. Intraperitoneal injection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Metais	20
2.1.1. Cobre	21
2.1.2. Cádmio	22
2.2. Isótopos estáveis como traçadores	24
2.3. Bioindicadores e biomarcadores	25
2.3.1. Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	26
2.3.2. Metalotioneínas (MTs)	28
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Ictiofauna	32
4.2. Ração empregada no experimento	33
4.3. Infraestrutura experimental	33
4.4. Aquários experimentais	34
4.5. Reagentes e soluções	36
4.6. Procedimento de limpeza.	38
4.7. Instrumentação e acessórios utilizados para as determinações	38
4.8. Experimental	39
4.8.1. Aclimação dos peixes	39
4.9. Testes toxicológicos	40
4.9.1. Ensaio preliminar com Cd e Cu	40
4.9.2. Ensaio de toxicidade aguda	41
4.9.3. Injeções intraperitoneais (IP)	43

4.9.4. Extração e purificação de proteínas	48
4.9.5. Separação eletroforética dos extratos proteicos	50
4.9.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	50
4.9.5.2. Eletroforese capilar (EC)	54
4.9.5.3. Digestão em gel	56
4.9.5.4. Digestão trípica	59
4.9.5.5. Eluição dos peptídeos	60
4.9.5.6. Purificação dos peptídeos	60
4.9.6. Espectrometria de massas (ESI-MS) e (MALDI TOF/TOF)	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Testes toxicológicos	64
5.1.1. Ensaio preliminar com Cd e Cu	64
5.1.2. Ensaio de toxicidade aguda	73
5.1.3. Bioconcentração de Cobre e Cádmiio	77
5.1.4. Injeção intraperitoneal	82
5.2. Extração e purificação das proteínas	87
5.3. Eletroforese	88
5.3.1. Géis de poliacrilamida	88
5.3.2. Eletroforese capilar (EC)	95
5.4. Marcadores isotópicos	97
5.5. Espectrômetro de massas com eletronspray (ESI-MS/MS)	103
6. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS	104
6.1. Resíduos líquidos	104
6.2. Resíduos sólidos	105
7. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

O sistema aquático representa o recipiente final para uma grande variedade de substâncias produzidas e liberadas no ambiente, tanto por processos naturais, como por atividades antrópicas (SPERLING, 1993; BOPP et al., 2008).

Dentre os processos naturais encontram-se, por exemplo, o intemperismo e a erosão de rochas e do solo. Deste modo a liberação de metais no ambiente é verificada, onde permanecem associados a minerais e a matéria orgânica. Transportados pela chuva e pelo vento, chegam até os rios, lagos e mares constituindo-se possíveis fontes de poluição.

As atividades antrópicas são fontes conhecidas de agentes xenobióticos incluindo metais. Neste conjunto, dois grupos de substâncias podem provocar o desequilíbrio natural nos sistemas aquáticos: os nutrientes, que promovem o crescimento biológico e, por conseguinte, a depleção do oxigênio; e a pequena taxa de degradação de dejetos e substâncias sintéticas causando efeitos múltiplos e variados.

Dentre os contaminantes existentes, incluem-se hidrocarbonos aromáticos polinucleares, pesticidas organoclorados, clorofenóis, policlorados bifenílicos, hexaclorohexanos, hexaclorobenzenos, dibenzenofuranos, nitoaromáticos, dibenzo-p-dioxina e outros compostos heterocíclicos, compostos organometálicos, radionuclídeos, fertilizantes organofosfatados, surfactantes e metais, tais como Cd, Hg, Ag, Co, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, etc, os quais podem afetar o colocar em risco a vida dos organismos que habitam esse meio (MAZON et al. 2000, LIVINGSTONE 2001, SARKAR 2006). Os metais não sendo biodegradáveis são facilmente incorporados à cadeia alimentar e tornam-se tóxicos aos organismos vivos quando ultrapassam determinadas concentrações (BRITTO, 2003).

De acordo com a (CETESB, 1994-2002) os despejos de resíduos industriais, ênfase as indústrias metalúrgicas, contaminam os cursos de água através da descarga direta de seus efluentes, liberando metais potencialmente tóxicos nos

corpos d'água. Pesquisas tentam elucidar se a produção de ligantes orgânicos podem atuar na atividade de processos relacionados ao controle da biodisponibilidade de metais ou se estes são subprodutos de processos não relacionados ao ciclo biológico (MACKEY; O'SULLIVAN 1990).

Os peixes como parte da composição dos sistemas aquáticos, podem se tornar organismos indicadores da ocorrência de contaminantes nesses ambientes (LINDE et al., 2004). A ictiofauna apresenta respostas orgânicas relacionadas direta e indiretamente à presença de metais na sua forma iônica nesses ecossistemas (PERTTÄ et al., 1982; MAYON et al., 2006) e desta forma, ocorrem interações com estas, as quais podem se manifestar através de reações orgânicas e pela formação dos compostos orgânicos específicos (LINDE et al., 2004).

Dentre as respostas dos organismos às condições do meio, como a exposição a metais, pode-se observar a superexpressão da metalotioneína, uma proteína observada em diferentes órgãos, em concentrações e organismos diversos da biota (KITO et al., 1986; NORBERG, 1978).

Metalotioneína (MT) é o nome dado a um grupo de proteínas solúveis de baixa massa molecular (6 a 7 KDa), presente em diversos órgãos dos seres vivos como fígados, rins e outros, capazes de complexar cátions metálicos através dos grupos tiol (SH) de seus resíduos de cisteína (VIARENGO et al., 1997). Uma das formas de indução na formação destas proteínas é através da presença de metais, geralmente os bivalentes, devido à capacidade da proteína se ligar à forma iônica destes (VIARENGO, 1993; ROESIJADI, 1992).

A metalotioneína (MT) foi isolada por Olafson e Thompson em 1974 a partir de vertebrados marinhos como a foca cinzenta *Halichoerus grypus*, e peixes como Cantarilho-cobre *Sebastes caurinus*. Desde então as características das MTs em peixes tem sido investigadas em várias espécies. (NOEL-LAMBOT et al., 1978; OVERNELL; COOMBS, 1979; KITO et al., 1986; PELGROM et al., 1995; GARCIA – SANTOS, 2006).

Um estudo feito por Cheung et al. (2005) com tilápias *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis aureus* demonstrou a efetiva resposta induzida por

metais nas MTs em nível hepático. O autor propõe a espécie como um potencial biomarcador, uma vez que, apresentaram-se sensíveis à exposição a vários íons metálicos, incluindo Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} .

De acordo com o CONAMA, os teores máximos permitidos para cobre e cádmio na água de rios e lagos classe I são de 0,02 mg/L de Cu e 0,001 mg/L de Cd. Em peixes podemos observar limites de tolerância bem mais elevados como estudado por Garcia Santos e colaboradores (2006) que observaram a dose letal 50 em tilápias de 14,8 mg/L, entretanto para indução de respostas orgânicas como a metalotioneína, Viarengo et al. (1985) demonstraram que, em ostras, teores de 40 $\mu\text{g/L}$ para cobre e 200 $\mu\text{g/L}$ para Cd são suficientes.

Neste sentido a presente pesquisa investigou o efeito de doses respostas entre o cobre, um metal essencial ao desenvolvimento dos peixes, porém tóxico quando disponível em concentrações elevadas e o cádmio, um metal não essencial, considerado tóxico aos organismos aquáticos em geral.

A utilização de isótopos estáveis na investigação da indução da MT pode ser útil no sentido de facilitar a rastreabilidade do metal introduzido no organismo através da visualização do percurso percorrido, e subsequente elucidação da participação do metal de interesse nos sistemas metabólicos envolvidos. O Cobre, por exemplo, é um metal essencial e por esta razão está presente em quase todos os tecidos animais como, desta forma através da presença de um isótopo, ou simplesmente calculando a razão isotópica em um determinado tecido pode-se identificar a presença do metal introduzido com grande precisão.

Os peixes como modelo experimental são amplamente utilizados para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos. Dentro desta premissa, a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* pertence a um dos mais importantes grupos de peixes, e é reconhecida como modelo biológico, devido à sua fácil manipulação, a adaptação ao cativeiro e à manutenção em laboratório. Além disso, observou-se que as tilápias apresentam respostas diretamente relacionadas às adaptações resultantes da presença de metais poluentes em ensaios toxicológicos. (WU et al. 2000)

Neste sentido, diferentes metodologias têm sido utilizadas para a determinação e quantificação de metalotioneínas, etapa de fundamental importância para os estudos relacionados ao tema. Diversos trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas como gel SDS-PAGE e SDS 2D além da eletroforese capilar, espectrofotométricas (U.V - visível), cromatográficas, ensaios de saturação por metal e métodos imunológicos foram conduzidos, no intuito de identificar, quantificar ou separar a proteína. (HONDA et al., 2005, VIARENGO et al., 1997, GHARAH DAGHI et al., 1999, GERVASIO et al., 2003).

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as principais técnicas citadas na literatura para identificação e das metalotioneínas, entretanto adaptações importantes contribuíram para estabelecimento de um protocolo específico no estudo toxicológico com tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metais

Metais são elementos químicos reativos e bioacumuláveis. Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns desses elementos, para a realização de suas funções vitais. Alguns desses elementos são: cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio e zinco, considerados essenciais.

Em geral, esses metais essenciais ocorrem em baixas concentrações nos sistemas aquáticos naturais, na ordem de nanogramas a microgramas por litro (BINEY et al., 1994). Níveis excessivos desses elementos em organismos aquáticos podem ser extremamente tóxicos (SANCHEZ et al., 2005).

Outros metais potencialmente tóxicos como o mercúrio, chumbo e cádmio, podem provocar reações não desejáveis ao organismo (LINDE, 1996; TAGLIARI et al., 2004). Estes metais podem ser ingeridos ou absorvidos e acumulados nos tecidos dos peixes. A diferença da quantidade absorvida e excretada nos peixes pode ser bioacumulada, possibilitando a biomagnificação através da cadeia trófica (ATLI; CANLI, 2003).

No Japão, após os acidentes da Baía de Minamata e em Niigata, nas décadas de 40 e 50, cerca de 1740 pessoas morreram ou vieram a adoecer, apresentando sequelas, devido à ingestão de peixes e mariscos com altas concentrações de metilmercúrio. Sabe-se que outros animais, como gatos e ratos também foram afetados. Desde então, o interesse no controle e os efeitos de metais potencialmente tóxicos em organismos são crescentes, e muitas pesquisas foram desenvolvidas com essas finalidades.

Da mesma forma, diversos países têm buscando determinar os limites tóxicos e os prejuízos à integridade de animais, seres humanos e plantas, por metais

potencialmente tóxicos (DETENBECK; BREZONIK 1991; DIRILGEN, 2001; MACFARLANE; BURCHETT, 2002).

2.1.1. Cobre (Cu)

O Cobre, classificado como metal de transição, Grupo 11 (1B), da Tabela Periódica, é um dos mais abundantes elementos químicos na natureza. Embora seja um elemento essencial com numerosas funções na bioquímica celular (cofator para diferentes enzimas) (BURKE; HANDY, 2005; OLIVEIRA et al., 2008), pode se tornar inibitório e em última análise, tóxico em concentrações mais elevadas (DE BOECK et al., 2004). Em sistemas aquáticos classe 2, de acordo com a resolução do CONAMA (RESOLUÇÃO nº357/05), os padrões de qualidade da água devem apresentar os limites máximos para cobre dissolvido em água de $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em vertebrados, o cobre participa de processos fisiológicos como da cadeia respiratória, fazendo parte do complexo citocromo oxidase. Este elemento também participa do processo de síntese de hemoglobina. Além destes, o cobre está presente em diversos processos metabólicos como o aproveitamento adequado do ferro; na síntese do colágeno e da elastina por estar presente no centro ativo da lisil oxidase, enzima que produz interligações entre as cadeias polipeptídicas (LENHINGER, 2000; GAGNON et al., 2006). O Cobre participa ainda da síntese da melanina e da síntese de catecolaminas como a dopamina, adrenalina e nor-adrenalina.

Os metais podem se acumular em vários órgãos. No caso do cobre, o principal órgão de absorção é o fígado, onde ocorre a homeostase deste metal (CARVALHO; FERNANDES, 2008; OLIVEIRA et al., 2008). As brânquias também se constituem em órgão importante para a realização de testes de absorção em peixes, por absorver espécies químicas dissolvidas presentes na água, e pela troca de gases e outras substâncias resultantes dos processos de interação com o solvente (OLIVEIRA et al., 2008).

O mecanismo de toxicidade do Cu em peixes de água doce envolve distúrbios nas brânquias, com uma rápida acumulação de Cu neste órgão seguido por acumulação em órgãos, como fígado, rim e músculo (GROSELL et al., 1998; LAUREN; MCDONALD, 1985).

Os íons de Cu podem afetar substâncias anti-oxidantes em tecidos por induzir ciclos de oxi-redução através de reações de Fenton, causando danos graves às membranas celulares peroxidativas, DNA e outras macromoléculas (ATLI 2006; PANDEY et al., 2008). Além disso, o íon Cu^{2+} pode atuar diretamente, através da ligação com grupos SH da proteína carregada negativamente e desnaturação das enzimas, ou indiretamente através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (como o peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais de hidroxila), resultando no estresse oxidativo (AHMAD et al., 2006).

O cobre é considerado um modelo adequado para investigar interações entre os metais-ligantes em águas naturais, assim como em sistemas de água afetadas pelas ações antropogênicas devido ao grande número de estudos sobre a sua separação, especiação, biodisponibilidade, toxicidade e, em geral, pelo comportamento em águas doce ou salgada (FLORENCE et al., 1992; LU; ALLEN, 2001; MEYLAN et al., 2003).

2.1.2. Cádmio (Cd)

O cádmio, número atômico 48, é também classificado como metal pertencente ao grupo B II da Tabela Periódica dos Elementos Químicos, ocupando a posição 12B, vizinha ao cobre. O Cádmio possui 8 isótopos estáveis com as seguintes porcentagens: ^{106}Cd (1,22%), ^{108}Cd (0,88%), ^{110}Cd (12,39%), ^{111}Cd (12,75%), ^{112}Cd (24,07%), ^{113}Cd (12,26%), ^{114}Cd (28,86%) e ^{116}Cd (7,58%) (ADRIANO, 2001).

Este metal pode entrar no ambiente a partir de várias fontes antropogênicas, tais como subprodutos da refinação de zinco, resíduos de minas, processos de

galvanoplastia, ferro e produção de aço, pigmentos, fertilizantes e pesticidas (USEPA, 2001). o Cádmiu também ocorre em rochas magmáticas e sedimentares. Ao se mineralizar, vai para a solução do solo, e pode ocorrer como Cd^{2+} e outros íons complexos e quelatos orgânicos (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992). São solúveis em água o cloreto, o nitrato e o sulfato de cádmio, apenas o sulfeto de cádmio é insolúvel em água (SOUZA et al.1998). Pequenas concentrações em água doce, rios ou lagos, são consideradas tóxicas de acordo com a organização mundial de saúde. Segundo o CONAMA(res. 357/05) os valores máximos permitidos de cádmio total em águas classe 2 nas quais é permitido a atividade de pesca comercial é de 0,001 mg.L⁻¹

O cádmio tem sido muito utilizado em estudos de toxicologia, em função do aumento significativo da sua concentração no ambiente, devido à crescente acumulação de resíduos industriais e domésticos (WRIGHT; WELBOURN, 1994; GOERING et al., 1995). Neste sentido, as propriedades cumulativas que possui nos organismos devido à sua característica persistente, lhes conferem um significado ecológico de importância (JENSEN; BRO-RASIRIUSSEN, 1992; ALAZEMI et al., 1996).

Na ictiofauna, o Cd pode estar envolvido em uma gama de efeitos patológicos como deformidades ósseas (MURAMOTO, 1981) e danos na estrutura branquial (GARDNER; YEVICH, 1970; KARLSSON-NORRGREN et al., 1985; PRATAP; WENDELAAR BONGA, 1993; THOPHON et al., 2003; GARCIA-SANTOS et al., 2007). Sabe-se que a presença do Cd em concentrações elevadas pode originar a desova prematura, atraso no crescimento e aumento de mortalidade em peixes (BEHOLT et al., 1976).

Chowdhury (2004) observou que o excesso de cádmio em organismos aquáticos ocasiona dificuldades na respiração. Outros efeitos deletérios proveniente da exposição ao cádmio são mudanças na hematologia, ou seja, na composição do sangue (ZIKIC; STAJN, 2001) como mudanças nas concentrações de cortisol e glicose, os quais revelam a respostas ao estresse em peixes (FU et al., 1990; CHOWDHURY, 2004; LACROIX; HONTELA, 2004) e mudanças também

relacionadas ao equilíbrio de cálcio(Ca) no sangue (VERBOST et al., 1987; WICKLUND GLYNN et al., 1994).

O cádmio pode provocar câncer em seres humanos, tornando-se tóxico aos rins, pulmões e sistema reprodutor (PAGE; CHANG, 1994; SOUZA et al., 1998), além de se acumular no fígado de mamíferos (ALLOWAY; AYRES,1997).

2.2. Isótopos estáveis como traçadores

Os isótopos estáveis são de fundamental importância para pesquisa ambiental, pois podem ser utilizados como traçadores isotópicos. A grande importância do método dos traçadores é que os isótopos de um dado elemento, quer sejam radioativos ou estáveis, podem ser identificados numa mistura normal dos isótopos deste elemento, conforme o mesmo é encontrado na natureza, possibilitando o acompanhamento do elemento nos diferentes compartimentos do sistema em estudo (qualitativa e quantitativa) (BOARETTO; TRIVELIN, 2004).

Segundo Wolf 1969, o método do traçador isotópico é usado de três maneiras: 1) no isolamento, purificação e identificação de intermediários desconhecidos numa cadeia de reações; 2) para obter evidências da síntese (incorporação) e relações precursor-produto entre compostos conhecidos e 3) como uma ferramenta analítica no acompanhamento do curso de uma reação, de compostos conhecidos. Desta forma, o primeiro e o segundo método referem-se ao uso da técnica, mais sob os aspectos qualitativo e o terceiro, refere-se a técnica analítica por diluição isotópica, ou seja, de caráter quantitativo (BOARETTO; TRIVELIN, 2004).

O método do traçador isotópico pode ser empregado associado às técnicas químicas e bioquímicas: como a fotografia (autorradiografia) e cromatografia, entre outras. Em estudos onde quantificações são necessárias o princípio da diluição isotópica torna-se importante. (BOARETTO; TRIVELIN, 2004).

2.3. Bioindicadores e Biomarcadores

Bioindicadores podem ser definidos como espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causados por contaminantes em diferentes níveis de contaminação biológica (ADAMS, 2002). Já o termo biomarcador foi originalmente definido como alterações bioquímicas, fisiológicas ou manifestações celulares, promovidas por um estresse ambiental (GUTIÉRREZ et al., 2003).

Deste modo, qualquer sistema celular que sofre uma alteração fisiológica detectável promovida por algum estresse ambiental específico ou poluente pode ser utilizado como biomarcador celular, enquanto que moléculas envolvidas em alterações fisiológicas podem ser consideradas biomarcadores moleculares.

A biota pode ser utilizada como forma de se indicar a qualidade da água pelo fato de fazer parte do ambiente fornecendo, muitas vezes, informações mais precisas no monitoramento dos ecossistemas do que apenas os dados obtidos através de como as medidas dos parâmetros físicos ou químicos da água e dos outros componentes do sistema aquático. (LENAT; BARBOUT, 1994; ALBATERCEDOR, 1996).

Como citado, os metais podem interferir em várias vias metabólicas de células e induzir respostas celulares diferentes, dependendo das suas propriedades e concentração (CARVALHO; FERNANDES, 2008; CASADO-MARTINEZ et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; 2010). Estas respostas podem promover stress oxidativo por catalisar a formação de espécies de oxigênio reativo tais como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH), oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode gerar alterações de DNA e peroxidação da membrana lipídeos iniciando processo degenerativo celular (STOREY, 1996; LIEBLERE; REED, 1997; SCHLENK et al., 1999; OAKES; KRAAK, 2003; TAGLIARI et al., 2004; SANCHEZ et al., 2005).

Uma das respostas bioquímicas mais estudadas em células animais quando expostas a metais é a indução de metalotioneínas (ENGEL; BROUWER, 1989).

Compostos enzimáticos, como a acetilcolinesterase, produzidos a partir da presença de pesticidas também são utilizados em estudos de monitoramento ambiental (KIRBY, 2000).

2.3.1. Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de grande interesse na piscicultura atual, pois é o segundo grupo de peixes de água doce cultivado no mundo, ficando atrás apenas das carpas (LOVSHIN, 1997; ALCESTE; JORRY, 1998).

No Brasil, a tilápia do Nilo, proveniente da Costa do Marfim no Oeste africano, foi introduzida no nordeste em 1971 e, então, distribuída pelo país. Desde então, passou a ser a espécie mais cultivada, respondendo por cerca da metade da produção anual de peixes cultivados (LOVSHIN; CYRINO, 1998).

A tilápia do Nilo destaca-se como peixe de potencial para a aquicultura, visto a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995). Entretanto, os escapes com a água efluente, o esvaziamento dos tanques durante o manejo e, principalmente, o rompimento ou transbordamento desses em razão de picos de cheias não previstos durante a construção, são as principais vias de introdução de espécies exóticas em ambientes naturais pelas atividades de cultivo. A piscicultura é considerada o principal meio de dispersão de espécies exóticas em novos ambientes (WELCOMME, 1988).

Hoje, a tilápia se tornou importante, também pela sua abundância e importância socioeconômica em ambientes naturais. Ocorrendo naturalmente em rios e açudes até do semiárido Brasileiro (GURGEL; FERNANDO, 1994).

A utilização da tilápia como um bioindicador de qualidade de água tem aumentado ao longo dos últimos anos, devido a sua presença em grande parte dos corpos de água distribuídos por todo território nacional e também sua distribuição

pelo mundo. Todavia ainda são poucas as pesquisas desenvolvidas com essas finalidades em relação a esta espécie.

Fu et al. (1990) verificaram a resposta de *Oreochromis mossambicus* a doses subletais de Cd, observando o nível do hormônio cortisol no plasma sanguíneo e também a presença de MTs em brânquias, rins e fígados desses peixes. Em outra pesquisa, Pelgrom et al. (1995) observaram as respostas fisiológicas integradas decorrentes da contaminação por Cu em doses sub-letais nesses mesmos organismos. Entretanto, em nenhum desses trabalhos foram verificadas as interações entre os dois metais Cu+Cd.

Garcia – Santos (2005), observaram alta tolerância ao Cd por tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e concluíram que esta espécie poderia contribuir de modo significativo para a compreensão do mecanismo de toxicidade de organismos aquáticos pela exposição ao cádmio.

2.3.2. Metalotioneínas (MT)

São um grupo de metaloproteínas composto de uma cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas; estas representam em torno de 20 a 30% do total de aminoácidos que compõem as proteínas (STILLMAN, 1995). As MTs são proteínas de baixo peso molecular (\approx 6-7 KDa). A designação de metalotioneína reflete os teores extremamente elevados de tiolato de enxofre e conteúdo de metal na ordem de 10% (m/m) (ROMERO-ISART, 2002, KAGI; VALLEE, 1960).

As MT estão presentes em praticamente todos os seres vivos, desde algas até aos mamíferos mais complexos, podendo apresentar pequenas variações na sua estrutura de acordo com o grupo de ser vivo estudado. Menciona-se que em vertebrados não foi detectada a presença de grupos aromáticos e histidina (STILLMAN, 1995; ROESIJADI, 1992). São encontradas no citosol de células eucariotas, especialmente no fígado, rins e intestino (VIARENGO, 1989).

Em geral, as MTs possuem dois domínios, constituídos de dois clusters um com três beta (β) e outro com quatro átomos de metal ligados alfa (α) (Figura 1). A abundância de ligantes tiol dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere à proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz destas, proteínas interessante objeto de estudo sob o ponto de vista bioquímico

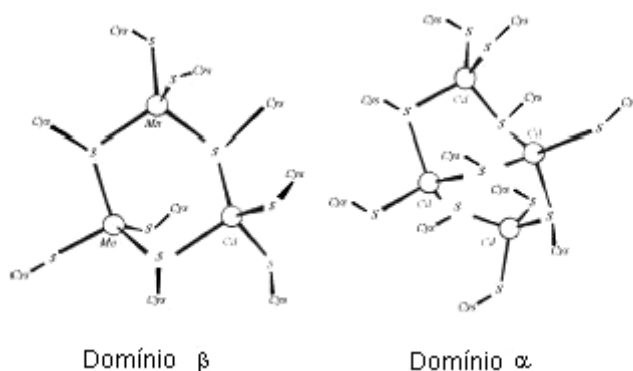


Figura 1 – Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína. Os círculos denotam íons metálicos bivalentes (ex. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) (VILLAR, 2006)

Estas proteínas apresentam diversas funções biológicas relacionadas ao grande número de metais ligados à macromolécula. Contudo, a principal função das MTs nos sistemas vivos ainda não está bem elucidada, embora existam várias hipóteses que incluem a regulação de metais essenciais como o zinco (Zn) e o cobre (Cu), ação como agente de desintoxicação para metais não essenciais como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), além de apresentarem um papel protetor por sequestro de metais e proteção contra condições de estresse exercendo uma função antioxidante na célula (ROESIJ ADI, 1992; LIVINGSTONE, 1993; LANGSTON et al., 2001; SCHIMITT et al., 2007; BEBIANNO, 2007).

Sendo assim, a MT é uma importante proteína no metabolismo intracelular de Cu e Zn. Alguns autores observaram que durante a homeostase dos metais essenciais, as MTs participam de vários processos bioquímicos, através do fornecimento de Cu^{+2} e Zn^{+2} para a biossíntese de metaloenzimas e metaloproteínas. A gama de metais capazes de se ligarem às MTs é ampla (VIARENGO, 1989).

A maior parte dos íons metálicos das famílias I-B e II-B da tabela periódica são conhecidos por se ligarem aos grupos cisteína-SH (que contém grupos sulfidríla) que são sítios para ligações com metais (STILLMAN, 1995). As MTs possuem alta

afinidade por metais, formando quelatos com íons de metais essenciais (Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc) ou não essenciais (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , etc) (VIARENGO, 1989). Apresentam diferentes afinidades por cátions metálicos ($Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$). (KITO et al., 1982; GEORGE; LANGSTON, 1994). Outra importante propriedade é que possui estabilidade frente ao calor, o que pode ser devido à ausência de aminoácidos com grupos aromáticos.

Um excesso intracelular de íons metálicos, tanto essenciais como não essenciais, pode causar efeitos danosos ao organismo, impedindo a conformação e o funcionamento das atividades enzimáticas e proteicas. Em geral, a síntese de MTs pode ser induzida sob elevadas concentrações de metais, promovendo uma maior captura dos íons metálicos limitando estes efeitos danosos (LANGSTON et al., 2001). O conhecimento dos fatores que controlam os níveis de MTs em diferentes espécies de peixes é essencial para a compreensão dos efeitos tóxicos induzidos por metais e também para o entendimento dos processos de desintoxicação (ROTCHER et al., 2001).

A habilidade de metais em induzir a síntese de MTs foi originalmente descrita por Piscator 1964, a qual mostrou existir um aumento nos níveis de MTs hepáticas em coelhos expostos a Cd. Desde então esta forma de regulação tem sido reconhecida em todas as espécies e células que sintetizam MTs (KITO et al., 1982; INÁCIO, 2006).

Em peixes, Viarengo (1989) observaram que os mecanismos de desintoxicação de metais não essenciais tendem a ocasionar um aumento na concentração de metalotioneínas. Outros pesquisadores também observaram esta relação (LANGSTON et al., 2001; BEBIANNO, 2007; FERNANDES et al.; 2008; SCHIMITT et al.; 2007). Todavia, Roesijadi (1992) observou que existe uma grande variação entre as diferentes espécies e os tecidos estudados.

Por todas as características dessa molécula, diversos estudos de biomonitoramento propuseram a utilização das MTs como biomarcador para contaminação por metais potencialmente tóxicos, utilizando diversas espécies de vertebrados e invertebrados (COSSON, 2000; GEFFARD et al., 2005).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi checar a formação da metalotioneína através da contaminação por isótopos dos metais ^{65}Cu (essencial) e ^{111}Cd (não essencial) em órgãos como fígado, brânquias e músculos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*).

Objetivos específicos

1. a) Determinar a toxicidade aguda (CL_{50}) para Cu, Cd e os dois metais em conjunto (Cd + Cu) em tilápias;
2. b) Verificar a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos desses elementos sobre as tilápias;
3. c) Determinar MTs e metais em branquias, fígado e no tecido muscular;
4. d) Conduzir experimentos que permitam promover a eliminação das MTs através de ensaios de toxicidade crônica pelo uso de injeção intraperitoneal de metais, empregando-se em ambos os casos materiais com razões isotópicas enriquecidas de ^{111}Cd , ^{65}Cu ;
5. e) Aprimorar a metodologia utilizada para estudos de metalotioneínas nos tecidos elegidos, envolvendo aspectos da extração, separação por eletroforese bidimensional e capilar;
6. f) Determinar o potencial das tilápias como bioindicadoras da contaminação existente por Cd e Cu;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Ictiofauna

No presente estudo, foram utilizados peixes da espécie tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, machos revertidos, os quais foram obtidos através do criatório localizado na Fazenda Experimental do Pólo Regional do Vale do rio Paraíba – Pindamonhagaba. (APTA, SAA/SP).



Figura 2 – Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), animal juvenil com peso aproximado de 20 gramas

Os peixes pesando aproximadamente 10g e foram transportados em sacos plásticos, aerados e adequados para este fim. Após o transporte os indivíduos foram colocados em tanques e submetidos ao período de aclimatação por pelo menos 2 semanas.

4.2. Ração empregada no experimento

Utilizou-se durante todo o experimento ração extrusada, específica para nutrição de Tilápias em sistemas intensivos de criação com teor proteico de 32%. Trata-se de uma ração da linha “Fri-Acqua” da marca Fri-Ribe comercializada em forma de grânulos com tamanho entre 4 a 6 mm. A composição nutricional encontra-se descrita na Tabela 1. Esta ração foi fornecida triturada durante a primeira semana para que todos os peixes tivessem acesso devido a uma pequena variação de peso entre os indivíduos do lote.

Após este período o arraçoamento foi conduzido oferecendo-se a ração inalterada fisicamente. Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos preliminares o fornecimento de ração era interrompido. Teores de Cd e Cu presentes na ração foram determinados (Tabela 1).

Tabela 1 - Teores de Cobre e Cádmiio em mg.Kg⁻¹ fornecidos pelo fabricante e obtidos na análise pelo ICP-OES

Ração do experimento		
	Cu	Cd
Dados do fabricante	25	ND
Analisado (lab.) (ICP-OES)	28,03	0,047

4.3 Infraestrutura experimental

Para manutenção dos indivíduos foram utilizados reservatórios de 1000L que se localizavam na ESALQ/USP no Setor de Piscicultura. Estes possuíam sistema de aeração e eram abastecidos com água de poço artesiano, contando com um sistema de renovação programado onde um terço do seu volume era trocado diariamente durante todo o período de aclimação.

Em paralelo foi montada infraestrutura com tanques de aclimação semelhante ao descrito acima no Centro de Estudos Ambientais (CEA) Laboratório

de Ecotoxicologia, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, na cidade de Rio Claro (UNESP- Rio Claro). Nestes tanques, a renovação da água era feita por um sistema de filtração biológica no qual um terço da água era filtrada e devolvida ao aquário diariamente. A água era decolorada previamente para ser utilizada na aclimatação dos indivíduos.

4.4 Aquários experimentais

Para o primeiro ensaio preliminar, desenvolvido na ESALQ, foram utilizados aquários de vidro contendo 20L de solução-teste, contendo 5 peixes em cada. Estes foram forrados com sacos plásticos transparentes a fim de evitar a adsorção dos metais às paredes dos aquários (Figura 4). Estes aquários recebiam aeração constante e a água utilizada foi preparada de acordo com as normas da ABNT 15088 (2004).

Para o ensaios preliminar, agudo e crônico, desenvolvidos na UNESP-Rio Claro, foram utilizados aquários com capacidade para 40 litros, contendo 10 peixes em cada unidade, estabelecendo-se uma relação massa/volume ao redor de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$. Estes aquários não necessitavam de forração, pois sua composição era poliestireno e, portanto a adsorção de metais era minimizada (Figura 3). Neste experimento utilizou-se a mesma água descrita acima e o sistema de aeração também foi o mesmo.



Figura 3 – Cubas plásticas com telas na superfície, utilizadas nos ensaios preliminares e agudos de cobre, cádmio, cobre+cádmio e ensaios de injeção intraperitoneal (UNESP-Rio Claro)

Para o ensaio de injeção peritoneal utilizou-se aquários de vidro com 40 litros de água onde foram acomodados 10 indivíduos (Figura 4). Neste caso a água utilizada era a mesma da aclimatação e não foi realizado o forramento dos aquários. Para este experimento a aeração foi também constante.

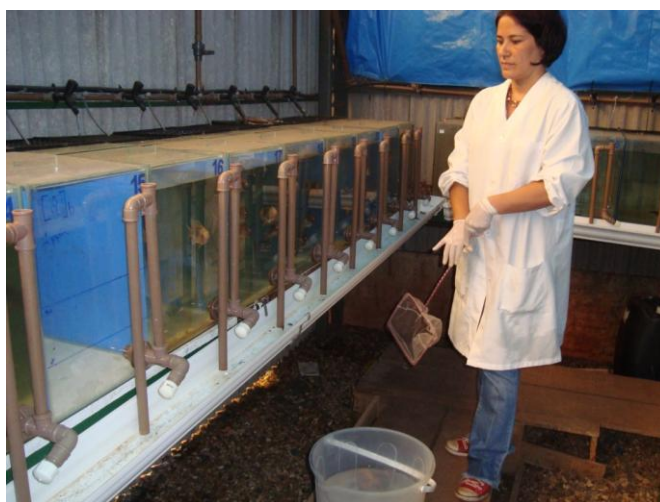


Figura 4 - Instalações utilizadas nos experimentos de injeção intraperitoneal localizado no setor de piscicultura da ESALQ/USP. Aquários de vidro contendo as Tilápias

4.5 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico e água de alta pureza (18,2 MΩ.cm), purificada com sistema de filtração Milli-Q (Millipore).

O padrão de massa molecular utilizados nos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida foi o Ultra Low Range Molecular Weight Marker (M.W. 1,06-26,60) (cat#M3546, Sigma), para os mesmos testes utilizou-se o padrão o de MT de fígado de coelho (Lote L24392, Alexis) e (Lote L24401, Enzo).

Para o preparo do tampão de extração das proteínas os reagentes usados foram Tris Base (cat#15504020, Envitrogen), sacarose (cat# 040M00011, Sigma), leupeptina (Sigma), Ditiotreitól DTT (BioRad, cat#161-0611, MW=154,3), Beta-Mercaptoetanol (codM6250 111F-0272, Sigma), para a purificação das proteínas os solventes usados foram o Etanol (Sigma), Metanol (cat# 1060091000, Merck) e Clorofórmio (Sigma).

Foram preparadas soluções de albumina de soro bovino (BSA) 0,1%(m/v) (Merck), para a formação da curva utilizada na quantificação das proteínas, utilizou-se também com a mesma finalidade o corante Coomassie Blue G 250 (Sigma).

Soluções padrão de trabalho para Cd e Cu preparadas a partir de soluções estoques 1000 mg L⁻¹, JMC (Johnson Matthey Chem.) foram utilizadas para os bioensaios com injeções intraperitoneais. As soluções de metais isotopicamente enriquecidos ¹¹¹Cd (95,2at%) e ⁶⁵Cu(99,2 at%) nas concentrações 1000 mg L⁻¹ em Cd - CdCl₂ e Cu-CuO foram adquiridos do Cambridge Isotope Laboratory.

Ácidos nítrico e clorídrico da Sigma e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de alta pureza da Merck foram usados durante os experimentos nos procedimentos de solubilização dos tecidos. Para a separação em gel foram empregados, Glicina (cod g7126 Ca556-40-6, Sigma), Acrilamida (cat#15512-023, Invitrogen), Bis-Acrilamida (cod 171304- 02, Plusone), SDS (GR126-500 cas#151-21-3, Hoefer), TEMED (T7024 EC n°203-744-6, Sigma), Coomassie Blue G 250. Assim como sais de

Persulfato de Amônio (lot 090594, Serva) e Bicarbonato de amônio AmBic (NH_4HCO_3 , cat#9830, Sigma) foram utilizados na extração e preparo das amostras submetidas ao gel.

No preparo das amostras para análise proteica no MALDI -Tof/Tof e ESI - MS utilizou-se Acetonitrila ACN (cat#34967, Fluka), Iodoacetoamida IAA (cat#RPN6302V. GE), Tripsina (Promega Trypsin, Part No V511), Ácido Fórmico 96% (cat# 56302, Fluka/ Sigma-Aldrich), além do agente redutor DTT já citado acima.

Para as amostras analisadas no sistema de eletroforese capilar, utilizou-se o benzoato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$, lote 61762, Synth) como marcador e padrão de MT de fígado de coelho (sigma-Aldrich).

4.6. Procedimento de limpeza

No processo de descontaminação utilizou-se Extran 5%(v/v) para lavar a vidraria e em seguida HNO_3 10% (v/v) em banho por uma noite sendo posteriormente enxaguadas com água ultra pura (18,2 M Ω cm) purificada com o sistema de filtração Milli-Q (Millipore). O material utilizado na eletroforese, tais como cuba, espaçadores e vidros foram lavados com água destilada. Vidros, espaçadores e pentes foram submetidos à limpeza com metanol antes de sua utilização.

4.7. Instrumentação e acessórios utilizados para as determinações

Para etapa de extração e purificação das proteínas, preparo dos géis, e preparo das amostras para as análises, utilizou-se balança analítica, microcentrífuga refrigerada (5424R, Eppendorf), banho térmico (Isotemp 202, Fisher Scientific), micropipetas (Nichiryo Nichipet EX), Freezer de -80°C e, outro de -20°C, Homogeneizador (TE-102 Turratec, Tecnal), Kit Gel (Mini-Protean System Tetra Cell/ Single Core, Bio-Rad cat# 1658005), Espectrômetro de massas com electrospray Synapt G2 HDMS, Espectrômetro de massas Maldi TOF/TOF (AB SCIEX TOF/TOF 5800), Espectrômetro de emissão ótica com plasma ICP-OES (Optima 3000 Perkin Elmer), Espectrômetro de massas com fonte de plasma (Thermo Series X II).

4.8. Experimental

4.8.1. Aclimação dos peixes

Em ambos os sistemas descritos no item 3.4, na transferência dos organismos dos sacos de transporte para os tanques, procedeu-se o protocolo de adaptação que consistia em colocar os peixes sobre a água das caixas d'água dentro dos sacos plásticos, para que as temperaturas da água de transporte fossem aproximadas da temperatura da água dos aquários. Os sacos eram abertos aos poucos, permitindo a entrada de água do tanque dentro dos recipientes plásticos, isto visava o equilíbrio de pH antes da liberação dos peixes nos tanques de aclimação (Figura 5).

O período de aclimação se estendeu por quinze dias e durante este período a temperatura e oxigênio dissolvido da água foram monitorados semanalmente. Durante todo o período de aclimação os peixes receberam a ração descrita anteriormente, aproximadamente na proporção de 10% do peso vivo, distribuído em duas porções diárias.



Figura 5 - Tanques de aclimação para Tilápias, aerados continuamente e com renovação diária e constante de 1/3 do volume total da água, localizado na ESAL/USP

4.9. Testes toxicológicos

4.9.1. Ensaio Preliminar com Cd e Cu

Após a fase de adaptação realizou-se o experimento preliminar, este foi considerado um piloto desenvolvido no setor de piscicultura da ESALQ/USP. Neste experimento utilizou-se para a diluição dos sais metálicos a água de diluição de acordo com as normas da ABNT 15088 (2004). Também foram preparadas soluções estoques de 1000 mgL^{-1} de cada um dos metais a serem testados, o Cu e o Cd.

Foram colocados 10 peixes, machos revertidos em cada aquário para o ensaio desenvolvido no setor de piscicultura o ensaios desenvolvidos na ESALQ e para o ensaio preliminar desenvolvido na UNESP de Rio Claro foram utilizados 5 machos revertidos em ambos o peso estava compreendido entre 9 e 20g, procurando-se estabelecer uma relação massa/volume ao redor de 3 g L^{-1} conforme a norma da ABNT 15088 (2004).

Os ensaios preliminares tiveram duração de 48 horas e foram conduzidos em duplicata. Foram testadas quatro concentrações de Cu, Cd e Cu+Cd. As concentrações utilizadas foram calculadas para os metais a partir dos sais de cloreto de cobre e cloreto de cádmio. Procurou-se estabelecer uma distribuição em forma logarítmica das concentrações (0; 0,5; 5 e 50 mg L^{-1}), como sugerido por Hamilton et al. (1978). Neste caso o tratamento controle fora constituído apenas por água de diluição, feita através da reconstituição de água desionizada de acordo com as normas da ABNT 15088 (2004).

Os ensaios foram realizados na forma estática, utilizando a água de diluição. Cada aquário possuía um sistema de oxigenação suplementar para manter o nível de oxigênio dissolvido próximo da saturação e temperatura em torno de 20°C a 24°C . As variáveis pH, temperatura e dureza da água foram medidas no início do experimento.

Passadas 48 horas de ensaio, os peixes sobreviventes foram sacrificados utilizando-se a termonecrose utilizando-se gelo e na sequência acondicionados em sacos plásticos, etiquetados e mantidos em freezer a -20°C para futuras análises.

Os efluentes gerados foram armazenados em bombonas plásticas resistentes com capacidade de 30L, devidamente identificadas e enviadas para o setor de tratamento de resíduos do CENA/USP.

Posteriormente, baseando-se nas concentrações em que não foram observados óbitos e naquelas menos elevadas que tenham apresentado 100% de mortalidade, selecionados os respectivos intervalos de concentrações. Desta forma, concentrações CL_{50} , para cada um dos elementos Cd e Cu e também para a situação de ambos em conjunto, procurando-se evidenciar efeitos sinérgicos ou antagônicos os organismos, foram determinadas.

4.9.2. Ensaio de Toxicidade Aguda

Com o objetivo de determinar a toxicidade aguda de cobre e cádmio, foram realizados ensaios definitivos por um período de 96 horas com os metais isoladamente e combinados. A metodologia empregada nos ensaios definitivos foi estabelecida conforme recomendações da ABNT 15088 (2004) e USEPA (2002).

As concentrações estabelecidas para os ensaios definitivos foram baseadas nos resultados obtidos dos testes preliminares com cobre, e cádmio e cobre + cádmio. Essas estavam compreendidas entre a maior concentração nominal do agente tóxico que não se observou letalidade e a menor concentração nominal do agente tóxico, que causou letalidade a 100% dos organismos (ABNT, 2004).

Para o teste agudo com cobre utilizou-se o sal cloreto de cobre $CuCl_2$ e as concentrações utilizadas calculadas para o metal cobre foram as seguintes: 0,0 mg L^{-1} (Controle), 0,5 mg L^{-1} , 1,0 mg L^{-1} , 2,5 mg L^{-1} , 5,0 mg L^{-1} e 10,0 mg L^{-1} . Para o teste com cádmio utilizou-se o sal cloreto de cádmio mono-hidratado $CdCl_2 \cdot H_2O$ e utilizou-se as seguintes concentrações calculadas para o metal cádmio: 0,0 mg L^{-1}

(Controle), $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. Finalmente, para o teste com cobre + cádmio os sais descritos acima foram misturados e as concentrações foram: $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Controle), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, para cada um dos metais componentes da mistura.

Nesta etapa foram utilizados 10 peixes em cada aquário com 40 L de água, estabelecendo-se a relação massa/volume ao redor de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, incluindo-se o tratamento controle.

Os ensaios, realizados na forma estática, foram conduzidos em meio de água decolorada, como anteriormente estabelecido. Os aquários receberam oxigenação suplementar em cada tanque para manter os níveis de oxigênio próximos da saturação, monitorando-se as variáveis de pH, temperatura e OD da água a cada 24h. Além destas, foi medida a dureza da água para o controle de qualidade e para o devido ajuste caso fosse necessário. O ajuste era realizado trocando-se parte da água do aquário por água reconstituída, estas possuíam concentrações de Mg e Ca previamente calculadas, de forma que ao adicioná-la a solução do aquário manteria níveis satisfatórios destes minerais que são fundamentais no controle da dureza da água.

Durante o experimento, os óbitos foram retirados prontamente dos aquários, pesados e dissecados, sendo retirado o fígado, as brânquias e amostras do tecido muscular para análise de metais e presença de metalotioneínas em seus tecidos. As sub-amostras foram então pesadas e submetidas a congelamento a -20°C .

Os procedimentos analíticos envolvendo as etapas de extração das MTs e preparo de amostra será descrito abaixo no item 4.9.4. Essas mesmas amostras foram também analisadas quanto aos teores totais de Cd e Cu. Passadas às 96 horas de ensaio, os peixes sobreviventes foram sacrificados com auxílio de gelo, a uma temperatura próxima de 0°C , seguindo procedimento anteriormente descrito no item 4.9.1.

Nessas condições determinou-se a bioconcentração das espécies químicas, estabelecendo-se os níveis aproximados dos metais que foram empregados nos experimentos posteriores relativos à injeção intraperitoneal.

4.9.3. Injeções intraperitoneais (IP)

Uma possibilidade alternativa à admissão de poluentes metálicos em organismos aquáticos foi efetivada através do uso de injeções intraperitoneais (GUTIÉRREZ-PRAENA, 2012). As concentrações administradas foram estimadas, baseadas na literatura, ou também estabelecidas através dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os metais dissolvidos. É importante que a salinidade da solução que contenha o metal esteja ao redor de 0,6 a 0,9% NaCl. Utilizou-se as potencialidades dos traçadores com isótopos estáveis enriquecidos do Cd (^{111}Cd) e do Cu (^{65}Cu), visando o acompanhamento mais preciso do processo de eliminação dos metais e consequente desintoxicação dos organismos, além de possibilitar o estudo do acúmulo de Cd e Cu nos tecidos.

Previamente ao início dos ensaios, foi avaliado, através de um pré-teste, o efeito das injeções intraperitoneais sobre os indivíduos experimentados. Assim, após o período de aclimação, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal e observados por um período de 3 semanas. Paralelamente, outra população de peixes foi observada como grupo controle. Foi estabelecido um volume mínimo de solução introduzida nos organismos, com intuito de se reduzir efeitos da dose administrada aos indivíduos. Isso também foi ajustado em função de um ensaio experimental onde foram aplicados diferentes volumes de soluções salinas em grupos de peixes de mesmo peso dos utilizados nestes experimentos.

Definidas as concentrações de metais e os volumes das injeções peritoneais, iniciaram-se os experimentos para a análise do ciclo de desintoxicação dos metais testados. Foram aplicadas injeções de ^{111}Cd e ^{65}Cu , em diferentes concentrações para cada grupo de peixes.

Esta etapa experimental foi realizada no setor de piscicultura da ESALQ. Neste local, foram utilizados 6 aquários com capacidade de 40 L que possuíam controle de temperatura de forma que a água permaneceu durante todo o experimento a valores 28°C . O sistema foi mantido em fluxo contínuo com

renovação de um terço da água do aquário a cada 24h. Os parâmetros da água como amônia, oxigênio dissolvido e pH foram medidos a cada 48h.

Nestes aquários foram acondicionados grupos de dez indivíduos com peso aproximado de 20 ± 5 g por unidade experimental. Os indivíduos permaneceram em aclimatação por três dias previamente à utilização das injeções intraperitoneais. Assim que os espécimes estavam aclimatados, alimentando-se regularmente, iniciou-se o procedimento. Os animais receberam durante todo o experimento uma porção diária de ração que equivalia aproximadamente a 10% do peso vivo dos indivíduos.

Para proceder às injeções intraperitoneais, a ração foi suspensa com a antecedência de 24h. A seguir procedeu-se a retirada de todos os indivíduos dos aquários, os quais foram colocados em um recipiente graduado contendo 40 litros de água com temperatura igual a dos aquários. Este balde recebeu aeração durante todo o procedimento. Em seguida, outro recipiente em iguais condições, foi empregado para receber os peixes que estariam voltando do estado de anestesia, em observação antes da devolução aos aquários. Este era chamado de balde de recuperação.

Os peixes foram anestesiados individualmente, colocando-se em um recipiente que continha uma solução de dois litros de água e 2 mL (10% de eugenol/óleo de cravo). Após 45 segundos os peixes estavam totalmente imóveis e neste momento eram efetuadas as injeções intraperitoneais que continham as soluções e dosagens descritas acima. Em seguida, devolvidos aos baldes de recuperação, observando-se o comportamento e a coloração dos animais até que os mesmos se encontrassem em condições consideradas normais (cerca de 10 minutos após as injeções). Decorrido este período, os peixes foram colocados novamente aos aquários.



Figura 6 - Aplicação de 300 μL de solução de cobre ^{65}Cu 20 mg/L^{-1} diluído em 0,6% NaCl, através de injeção intraperitoneal na Tilápia (*Oreochromis niloticus*) anestesiada.

Foram aplicados dois volumes de injeção (150 μL e 300 μL) para cada metal (Figura 6). Nos animais do grupo controle também foram injetados os mesmos volumes dos tratamentos, porém estes continham somente solução de 0,6% NaCl (Figura 7). Sendo assim o experimento seguiu o esquema apresentado na Figura 7.

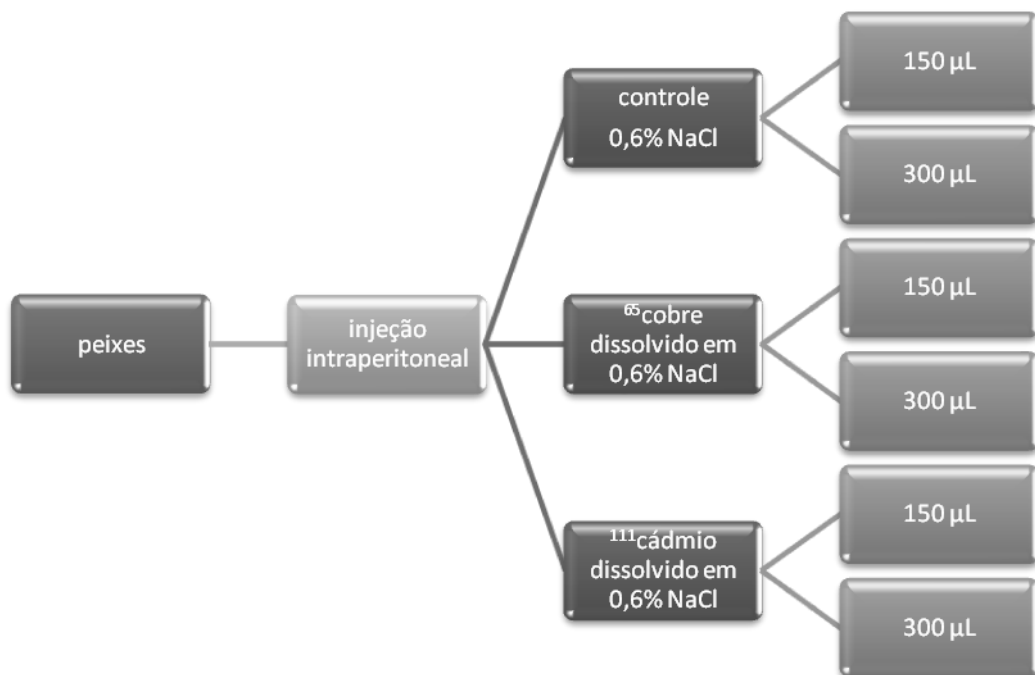


Figura 7 - Representação do experimento onde se utilizou injeções intraperitoneais e isótopos enriquecidos em Tilápias (*Oreochromis niloticus*)

Os ensaios foram conduzidos por um período de 14 dias. Foram procedidas 2 amostragens de peixes a cada 7 dias. Para tanto, 2 indivíduos de cada uma das repetições do tratamento controle e do tratamento com metais foram coletados para as determinações dos teores totais dos metais e das metalotioneínas.

Para retirada dos peixes utilizou-se gelo em recipientes com água. Após a adição do gelo na água a temperatura foi medida até que se obtivesse uma temperatura próxima a 0°C. Neste momento os peixes eram colocados no recipiente e deixados cerca de 15 minutos para que ocorresse o choque térmico e subsequente óbito este procedimento é denominado termonarcose e é muito utilizado em frigoríficos de pescado (PEDRAZZANI et al., 2009).

Após óbito os animais eram pesados, acondicionados em sacos plásticos, vedados e identificados. Estes sacos foram transportados ao laboratório em caixas de isopor com gelo. No laboratório os peixes foram acondicionados a -20° C, onde permaneceram até a dissecação. O procedimento de dissecação será descrito abaixo em detalhes. Este foi denominado experimento (A).

Com o objetivo de rastrear os marcadores isotópicos através da variação na razão isotópica dos metais Cd e Cu, realizou-se o experimento (B). Este foi desenvolvido no Laboratório de Ecotoxicologia da UNESP de Rio Claro. Para este experimento foram utilizados 3 aquários, sendo o primeiro o controle, no qual foram colocados 10 peixes e seguidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente no experimento A.

Os indivíduos do experimento B do controle receberam uma dose de 200 µL de solução 0,6% NaCl. No segundo aquário outros 10 peixes receberam uma dose de 200 µL de solução estoque de 7,5 mg . L⁻¹ de ⁶⁵Cu em 0,6 % NaCl, e por fim os indivíduos do aquário 3 receberam uma dose de 200 µL de solução de 15 mg.L⁻¹ de ¹¹¹Cd em solução salina 0,6%.

Neste experimento, após as injeções intraperitoneais, foram coletadas amostras da água a cada 24h e realizado o procedimento de rastreamento das razões isotópicas por (ICP-MS). Também foram coletadas as fezes diariamente em

todos os aquários. Estas foram filtradas em filtros de acetato de celulose e secas em estufa até atingirem peso constante. Após serem devidamente identificadas foram acondicionadas em pequenos recipientes acrílicos esterilizados, juntamente com os filtros, para futura digestão com ácido nítrico em micro-ondas e determinação por (ICP-MS).

Também no experimento B foram recolhidos os tecidos brânquias e músculos para a obtenção do citosol e análise das razões isotópicas por (ICP-MS)

4.9.4. Extração e purificação de proteínas

O método utilizado para realizar a extração das proteínas foi o de Viarengo (1997), com algumas modificações, que consiste na obtenção de uma fração contendo a metalotioneína parcialmente purificada através do tratamento das amostras com clorofórmio e etanol e precipitação com etanol e HCl.

Inicialmente, foram retirados os órgãos dos peixes a partir de uma incisão feita com bisturi na cavidade abdominal. Com pinça e tesoura cirúrgica separou-se cuidadosamente o fígado das vísceras para que não estourasse a vesícula biliar, órgão este bem aparente nos peixes. As brânquias foram retiradas com a ajuda das pinças e seccionadas com auxílio da tesoura. O tecido muscular foi cortado com bisturi após a separação da pele e escamas. Todos os tecidos foram lavados em água desionizada.

Após serem dissecados e pesados, cerca de 500 mg de tecido muscular e de brânquias e cerca de 100 mg de fígado, foram homogeneizados com auxílio do homogeneizador na proporção de 1:3 (m/v) em tampão de extração. Este tampão era constituído de solução Tris-HCl 20 mmolL^{-1} pH 8,5, Sacarose $0,5 \text{ molL}^{-1}$, inibidores de proteases (Leupeptina $0,006 \text{ mmolL}^{-1}$ e Fluoreto de Fenil Metil Sulfonil (PMSF) $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$ e o agente redutor (β –Mercaptoetanol 200 mmolL^{-1}).

Após homogeneização o material ficou em repouso durante 5 minutos e foi centrifugado a 20.000 g por 60 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recuperado (fração citosólica) e o precipitado descartado. A fração citosólica foi separada em três alíquotas que foram destinadas para a determinação de metais totais, proteínas totais e a outra fração, cerca de 1 mL foi purificada (Figura 8).

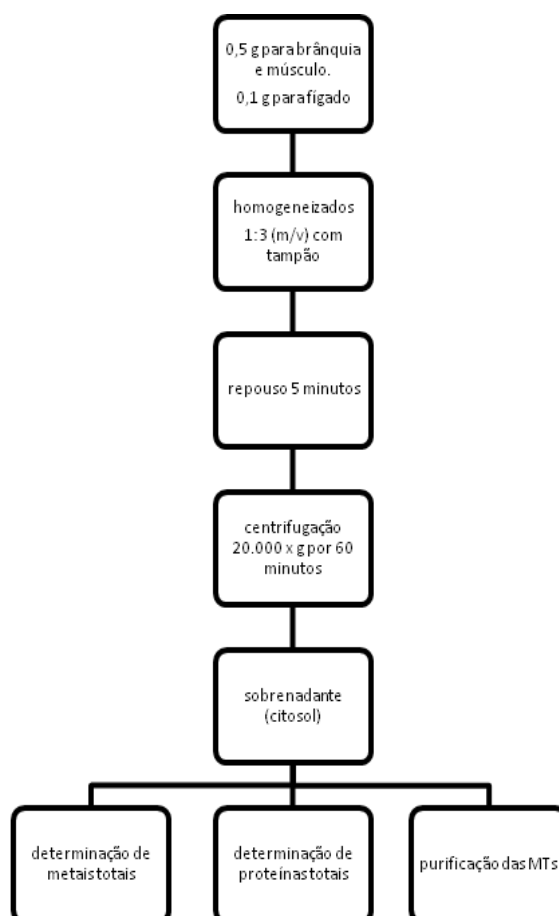


Figura 8 - Esquema do processo de obtenção do citosol extraído dos tecidos de de *O. niloticus*

Para purificação adicionou-se 1,05 mL de etanol 99% (-20°C) a 1,0 mL de sobrenadante (v:v) e 80,0 μL de clorofórmio a solução que constituiu a primeira etapa da precipitação alcoólica. Nesta etapa eliminaram-se as proteínas de maior massa molecular, restando uma solução contendo a fração proteica de menor massa molecular, incluindo as MTs.

Após um repouso de 5 minutos, a amostra foi centrifugada novamente a 6.000 g por 10 minutos a 4°C e o precipitado formado que continha as proteínas de maior massa molecular foi desprezado. Cada fração de 500,0 μL de sobrenadante foi tratado com 50,0 μL de solução HCl 37%(v/v) (SIGMA) e novamente com etanol 99% gelado (-20°C) na proporção de 1:3 (v/v). A precipitação nesta etapa objetiva a recuperação das proteínas de baixa massa molecular, incluindo as MT, restantes no sobrenadante. A adição do HCl nesta etapa visa a recuperação das metalotioneínas.

As amostras permaneceram em repouso por uma hora a -20°C , em seguida centrifugadas novamente a 6.000g por 10 minutos a 4°C . Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a uma lavagem para remover o excesso de ácido em $1500,0\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto e $17,0\ \mu\text{L}$ de clorofórmio e $207,0\ \mu\text{L}$ de tampão de extração (sem os inibidores de proteases e o agente redutor). Na seqüência, a amostra foi centrifugada a $6.000\ \text{g}$ por mais 10 minutos a 4°C , obtendo-se o pellet final contendo as MTs que foi seco em temperatura ambiente.

A fração destinada a dosagem de proteínas totais foi submetida ao método de Bradford (1976), sendo utilizado como padrão a albumina de soro bovino (BSA) $0,1\%$. As absorbâncias dos padrões e das amostras foram medidas a $595\ \text{nm}$. em um espectrofotômetro.

4.9.5. Separação eletroforética dos extratos proteicos

4.9.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida ou PAGE é uma técnica de separação de alta resolução empregada na seleção de marcas específicas de proteínas para posterior sequenciamento, identificação e/ou quantificação. Baseia-se na migração dos peptídeos carregadas em um meio, sob a aplicação de um campo elétrico contínuo.

Esta técnica habitualmente conhecida por SDS-PAGE foi inicialmente descrita por Weber e Osborn, 1969, sendo consagrada na literatura pelos trabalhos de Laemmli, 1970 e mais recentemente por Schagger e Von Jagow (1987). O detergente de sigla SDS é usado para desnaturar proteínas em várias subunidades e para cobrir as moléculas da proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca da proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se constante. Assim, como resultado, as proteínas são separadas em função do seu tamanho.

Um preparo de amostras apropriado é importante para obtenção de uma boa resolução na separação das proteínas, para isso é necessário que as proteínas das amostras sejam desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para garantir o completo rompimento das interações moleculares para que cada banda presente no gel represente uma proteína individual, característica.

Nesta pesquisa foram testadas duas concentrações para os géis de 16,5% e 12,5% de acrilamida. Ambos foram preparados a partir de um protocolo que continha acrilamida e bis acrilamida, tampão do gel constituído de Tris-HCl, persulfato de amônio, TEMED e água desionizada. As proporções de cada reagente e respectivas concentrações encontram-se apresentadas na tabela 2 e tabela 3

Tabela 2 – Formulação dos reagentes para concentração 12,5% para o gel de separação e 4% para o gel de concentração

Soluções	Concentração do monômero	Gel de	Gel de
		separação	concentração
		12,5 %	4%
1	Acrilamida/Bis 40%%T, 4%C	3,125 mL	0,45 mL
2	Gel tampão (Concentração)		1,25 mL
3	Gel tampão(principal)	2,5 mL	
4	SDS 10%	100 µL	50 µL
5	Água	4,375 mL	2,8 mL
6	Persulfato de amônio 10%	25 µL	50 µL
7	TEMED	19 µL	10 µL
	TOTAL	10 mL	4,5 mL

Tabela 3 - Formulação dos reagentes para concentração 16,5% para o gel de separação e 4% para o gel de concentração

Soluções	Concentração do monômero	Gel de separação	Gel de concentração
		16,5 %	4%
1	Acrilamida/Bis 49,5%T, 6%C	3,33 mL	-
2	Acrilamida/Bis 49,5%T, 3%C	-	0,8 mL
3	Gel tampão	3,33 mL	2,48 mL
4	Glicerol	1,33 g	-
5	Água	1,95 mL	6,66 mL
6	Persulfato de amônio 10%	50 µL	50 µL
7	TEMED	10 µL	10 µL
	TOTAL	10 mL	10 mL

Os géis foram estruturados em placas do Kit Gel no qual inicialmente montou-se um conjunto com duas placas onde se introduziu o gel fracionador. O tempo de polimerização foi aproximadamente 30 minutos, colocou-se água na superfície superior para que não houvesse o contato do gel com o ar durante a polimerização (Figura 9).

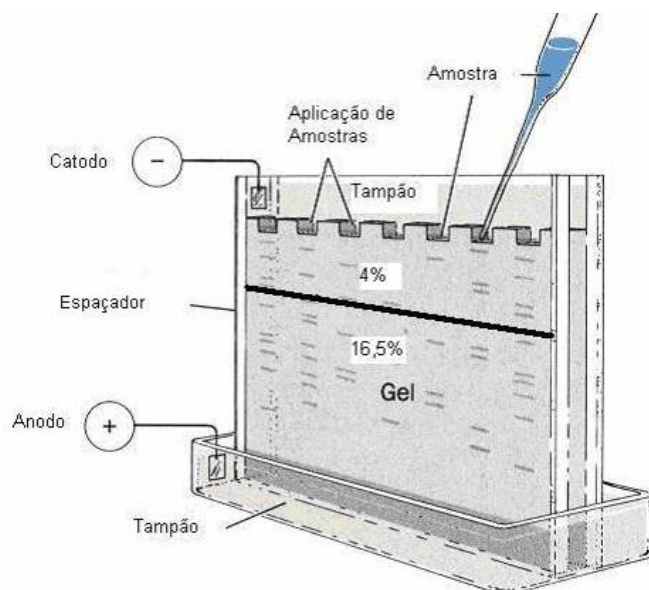


Figura 9 - Representação esquemática do gel SDS-PAGE (16.5% T, 3% C). (VILLAR, 2006)

Decorrido o tempo de polimerização a água foi retirada e adicionou-se o gel concentrador. Em seguida o pente de teflon foi colocado e aguardou-se novamente o tempo de polimerização que esteve em torno de 20 minutos. As placas foram acondicionadas no suporte no qual se adicionou o tampão interno anotado, que possui carga positiva, contendo Tris 0,2 M, SDS 20%, glicina 192 mmol.L^{-1} e água milli-Q., não sendo necessário ajustar-se o pH. Após a adição do tampão o pente de Teflon foi retirado cuidadosamente formando cavidades onde foram introduzidas as amostras. Após as corridas o tampão foi retirado e armazenado em geladeira a 4°C para ser reaproveitado em outros processos de separação.

No processo de corrida eletroforética utilizou-se o tampão externo de composição semelhante ao interno, suprimindo-se o SDS deste último.

Antes de introduzir as amostras procedeu-se o tratamento das mesmas com o tampão da amostra (0,4 mL de β -mercaptoetanol, 2,4 mL de glicerol, 8 mL de solução de dodecil sulfato de sódio 10% (m/v), 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} pH 6,8, glicerol, 5 mg Coomassie Blue G 250). Adicionou-se tampão de amostra na

proporção de 1:1 (tampão/amostra) e então as frações foram aquecidas por 2 min a uma temperatura de 65°C.

A corrida foi realizada em geladeira a 4°C e em temperatura natural, durante aproximadamente 2 h e 15 min, utilizando uma corrente de 10 mA para cada gel individualmente até a “linha de frente” atingir o gel fracionador, quando aumentou-se a corrente para 20mA. A corrida eletroforética foi acompanhada com migração de Coomassie G presente no tampão de amostra. Foram utilizados marcadores de peso molecular ultra baixo.

Os géis, após a corrida, foram corados em solução corante preparada a partir de Coomassie Brilliant Blue G 250 0,25 % por 5 horas sob leve agitação. Os géis foram então descorados com solução de ácido acético 10% (v/v) e metanol trocando esta solução a cada intervalo de 1 hora até se atingir a visualização das bandas proteicas.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em duplicata verificando-se assim a reprodutibilidade das mesmas. Os géis, após sua revelação, foram ensacados e digitalizados usando um “scanner” e armazenados para o recorte das bandas de interesse para identificação e quantificação das proteínas por ESI – MS e ICP-MS.

4.9.5.2. Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese capilar de zona (CZE) é um método muito eficiente utilizado na separação de substâncias por requerer pequenas quantidades de amostras, apresentar análise rápida, alta sensibilidade e alta resolução. Devido a formação de um fluxo eletrosmótico no interior do capilar é possível determinar moléculas aniônicas, catiônicas e sob determinadas condições também neutras. Minami (2002) fizeram uma revisão bem abrangente sobre os trabalhos que foram desenvolvidos utilizando-se a técnica de eletroforese capilar na separação de MTs.

Nesta revisão, Minami (2002) observam a investigação da MT em diferentes espécies de animais, plantas e microorganismos, e concluem que a técnica de CZE, combinada com outras técnicas, pode ser efetiva para a separação em análises qualitativas e quantitativas das isoformas de MTs em materiais biológicos.

Beattie et al.(1993), Wilhelmsen et al. (1998) estão entre os primeiros trabalhos de caracterização das MTs de fígado de coelho por eletroforese capilar com detecção UV e/ou espectrometria de massas. A partir daí várias espécies foram investigadas, porém poucas pesquisas foram desenvolvidas utilizando esta técnica na separação das MTs em peixes (ALVAREZ-LLAMAS, et al., 2003; PROFROCK et al., 2003).

Neste trabalho a CZE com detecção UV será utilizada para a identificação das MTs nos extratos de citosol do extraído de músculo, fígado e brânquia de tilápias, utilizando-se as mesmas condições descritas por Lavorente, 2003, com algumas modificações.

Inicialmente foram feitos testes para ajustar o equipamento às condições das amostras. Foram utilizados capilares não recobertos de sílica fundida com diâmetro interno de 75 µm e 70 cm de comprimento. As amostras foram injetadas por injeção hidrodinâmica, a 20 kPa por 5s com injeção de 327 nL e detecção a 200nm. Todas as corridas eletroforéticas foram feitas com a polaridade positiva na injeção da amostra.

Realizou-se o pré-condicionamento do capilar pelas adições em sequência das soluções de 1 mol L⁻¹ de HCl (10 min), 1 mol L⁻¹ de NaOH (10 min) água ultrapura (milli-Q) (10 min) e tampão (5 min). Após a análise de cada amostra o capilar foi recondicionado com 1 mol L⁻¹ HCl (1 min), NaOH (1 min), água ultrapura (milli-Q) (1 min) e tampão (1 min).

Foi utilizado tampão TRIS-HCl (70 mM, 5% metanol) de pH 8,2 e voltagem fixa de 20 kV.

4.9.5.3. Digestão em gel

Para a análise das metalotioneínas no ESI-MS recortou-se a banda de peso molecular conhecido (6,35 KDa) que correspondia a MT e procedeu-se a digestão em gel desse fragmento de acordo com o protocolo estabelecido por Shevchenko (2006), utilizado no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP, onde foram realizados esses experimentos.

Após escolher as bandas que representavam o peso molecular da proteína de interesse (6,35 KDa que correspondia a MT) (Figura 10) estas foram recortadas e procedeu-se a digestão em gel desse fragmento de acordo com o protocolo estabelecido por Shevchenko (2006), utilizado no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP onde se desenvolveu esta etapa da pesquisa.

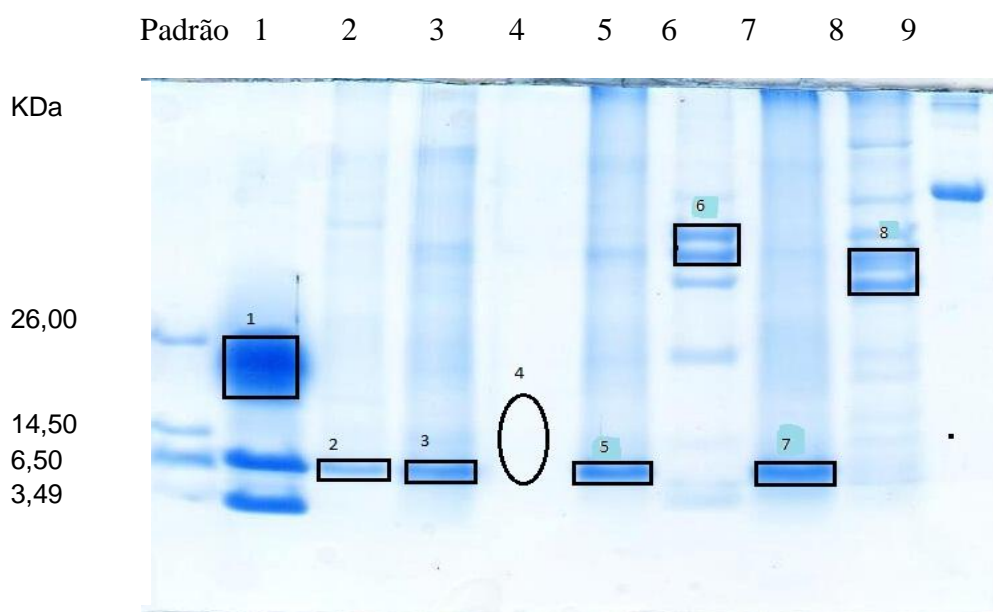


Figura 10 – Imagem de gel obtido por SDS-PAGE, 12,5%T 3%C ressaltando as bandas recortadas para análise de proteínas no espectrômetro de massas (ESI-MS)

Previamente atentou-se para todos os cuidados na utilização dos ácidos e solventes orgânicos. Estes foram manipulados sempre no interior das capelas de exaustão e descartados de acordo com as normas para descarte de resíduos. Atentou-se também aos cuidados necessários para minimizar contaminações com queratina, polímeros e outras impurezas que podem interferir na qualidade dos resultados das amostras.

Um ponto crítico desta digestão é o preparo das soluções. Estas devem ser novas, preparadas na quantidade necessária, no dia do uso. Inicialmente prepara-se um volume maior de 50 mM de Bicarbonato de Amônio e a partir desta solução, preparam-se todas as outras. Soluções utilizadas encontram-se apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Soluções utilizadas para digestão em Gel de acordo com o protocolo de Shevchenko et al. (2006)

Soluções	Reagentes e concentrações
Solução de descoloração (ACN)	50%(v:v) ACN e 25 mmolL ⁻¹ de AmBic 100%
Solução de redução	20 mmolL ⁻¹ ditrioteitol em 50 mmolL ⁻¹ AmBic
Solução de alquilação	55 mmolL ⁻¹ IAA em 50 mmolL ⁻¹ de AmBic.
Solução de tripsina	tripsina (estoque de 10ng/μL)
Solução bloqueadora	5%(v:v) ácido fórmico 96% em 50%(v:v) ACN.
Solução de eluição I	60%(v:v)metanol e 1%(v:v) ac. fórmico
Solução de eluição II	50%(v:v)ACN e 1% AC. fórmico

As bandas foram recortadas com bisturi cirúrgico esterilizado e colocados em placas de petri previamente lavadas com metanol. As bandas foram picotadas com o bisturi em pedacinhos de aproximadamente 1mm. Estes fragmentos foram recolhidos em tubos plásticos onde foi adicionada a solução de descoloração (200 μL por spot) e em seguida a amostra foi homogeneizada no vortex por 10 min. Foi utilizado um tempo de pausa de 15 minutos. Para a remoção completa do corante o processo de lavagem foi conduzido, por três vezes.

Após a descoloração, toda a solução foi removida e foi iniciada a desidratação adicionando 200 μL de ACN (100%) em cada banda. A solução ficou em contato com a amostra por 10 minutos e em seguida foi descartada. Este processo foi repetido até a desidratação do gel. Para que o procedimento se complete é desejável que os fragmentos fiquem brancos e se soltem facilmente da parede do tubo. O resíduo remanescente do gel foi evaporado a temperatura ambiente.

O passo seguinte foi o da redução dos fragmentos. Para isso foi adicionado aos fragmentos à solução de reidratação (40μL por spot) e estes permaneceram a 56°C (banho-maria) por 40 min. Em seguida realizou-se uma agitação rotativa, do inglês “spin” nas amostras removendo-se a solução de DTT.

Para a alquilação das amostras, adicionou-se solução de alquilação ao tubo que continha as amostras até que os fragmentos estivessem totalmente cobertos.

Estes foram colocados no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min. Após este período, o sobrenadante foi descartado e os spots foram lavados com a solução AMBIC e posteriormente desidratados em solução ACN (100%).

4.9.5.4. Digestão triptica

A tripsina liofilizada foi ressuspensa vagarosamente em tampão de ácido acético a 50 mmol.L^{-1} . O preparo desta enzima foi de acordo com o procedimento padrão do laboratório Max Feffer (ESALQ) no qual foram realizadas as digestões tripticas e recomendação do fabricante.

Inicialmente foram pesados $20 \mu\text{g}$ de tripsina e esta diluída em $200 \mu\text{L}$ de ácido acético sendo então preparada a tripsina em uma concentração de $100\text{ng}/\mu\text{L}$. Em seguida esta solução foi distribuída em mini tubos em alíquotas de $10 \mu\text{L}$ e mantida congelada a -80°C até o momento do uso.

Seguindo o procedimento da digestão triptica, foi adicionado $15 \mu\text{L}$ da solução de tripsina preparada anteriormente, ou seja, $20\text{ng}/\mu\text{L}$ nos fragmentos de géis desidratados. Foi utilizada uma relação de tripsina:proteína em torno de 1:50. A amostra foi mantida em repouso por 15 minutos a 4°C para que a tripsina penetrasse nos fragmentos de gel e em seguida foi retirado o excesso de tripsina. Para finalizar foi adicionado 50 mmol.L^{-1} de AMBIC até a cobertura das bandas, sendo que estes permaneceram na incubadora a 37°C por 14 horas.

4.9.5.5. Eluição dos peptídeos

Foram utilizados 15 μL da solução bloqueadora para interromper a ação da tripsina. Em seguida procedeu-se a eluição I em que se adicionou entre 30 a 50 μL da solução de eluição I, o suficiente para cobrir as bandas. Esta solução ficou em repouso sob imersão por 15 min a 40°C. Este passo foi realizado duas vezes e em seguida foi recolhido o sobrenadante de cada lavagem e colocado em tubo novo.

Em seguida foi adicionado volume suficiente para cobrir os spots da solução de eluição II (30 a 50 μL), e mantidos em repouso, sob imersão por 15 min a 40°C. Este passo foi realizado duas vezes, como na eluição I, e mais uma vez o sobrenadante de cada lavagem foi recolhido e acondicionado em tubo novo (o mesmo tubo que continha as lavagens anteriores).

A eluição 3 foi feita adicionando 30 a 50 μL de ACN 100% para desidratar os fragmentos de gel mais uma vez e o sobrenadante foi recuperado no mesmo tubo das lavagens anteriores. Finalizando o processo a solução contendo os peptídeos eluídos foi submetida ao concentrador a vácuo até reduzir-se o volume para 1 μL , armazenando-se em freezer a - 20°C até a análise por espectrometria de massas (ESI-MS/MS). Neste momento a amostra foi ressuspensa em 13 μL de ácido fórmico 0,1% (v/v) e inserido no equipamento.

4.9.5.6. Purificação dos peptídeos

Antes da análise em ESI-MS/MS, as misturas de peptídeos precisam ser purificadas. Para esta finalidade utilizam-se os Zip Tips, que podem ser chamadas de colunas de fase reversa.

Inicialmente foi ajustado o pH das amostras para 4, nesta etapa as amostras foram ressuspensas em solução TFA 0,1% preparado em água ultra pura (milli-Q) (10 μL).

A ponteira contendo a coluna foi inserida na pipeta e foi aspirado 10 μL de solução de equilíbrio I dispensando-a no lixo 3 vezes. Em seguida o mesmo procedimento foi repetido com a solução de equilíbrio II. Posterior a este foi realizado o passo de ligação da amostra a coluna. Nesta etapa foram aspirados 5 μL da amostra de peptídeos de 7 a 10 vezes para aumentar a fixação em misturas complexas.

Para lavagem dos sais e peptídeos sem interesse aspirou-se 10 μL da solução de água desionizada e TFA 1% dispensado no lixo 3 vezes. Novamente procedeu-se outra lavagem em que foram aspirados 10 μL da solução 5% metanol e TFA 0,1% e dispensado no lixo mais 3 vezes.

Com o objetivo de eluição dos peptídeos, 5 μL da solução de ACN em TFA 0,1% foi aspirado e dispensado pelo menos 3 vezes em tubo novo. Desta forma as amostras estavam prontas para serem inseridas no equipamento e analisadas.

4.9.6. Espectrometria de massas (ESI-MS) e (MALDI TOF/TOF)

Em amostras que não sofreram a separação por gel SDS-PAGE, outro procedimento é adotado com o objetivo de preparar os extratos para tornar possível a identificação das proteínas. Após a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, 1976 contidas nos extratos parcialmente purificados de MTs, as amostras foram diluídas em bicarbonato de amônio AMBIC obtendo-se uma concentração de proteína correspondente a 1mg/mL.

Procedeu-se então a digestão tríptica com a finalidade de fracionar a proteína em cadeias peptídicas, as quais foram identificadas e quantificadas com o auxílio do MALD TOF/TOF e posteriormente a introdução no espectrômetro de massas ESI-MS/ MS. Estas foram consideradas amostras complexas pelo fato de não terem sido separadas em gel SDS-PAGE.

A digestão proteolítica é uma etapa fundamental para gerar os peptídeos com massas molares dentro da faixa de massa dos espectrômetros. Normalmente esta digestão é realizada com a protease tripsina. A tripsina cliva as ligações peptídicas das proteínas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R) e possui alta atividade proteolítica além de produzir peptídeos pequenos na faixa de 600 a 2500 Da.

Sendo assim, uma alíquota de 25 μL da amostra foi transferida para microtubos com capacidade de 2 mL; a esta solução de proteínas que estava em uma concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ adicionou-se $25\mu\text{L}$ de solução 0,2% rapigest SF preparadas a partir de 1 mg do sal RapigestSF e mais $500\mu\text{L}$ de água desionizada. Esta solução foi incubada por 15 minutos a $80\text{ }^\circ\text{C}$.

Em seguida, foi realizado um “spin” de um minuto para a que as gotículas aderidas às paredes dos microtubos fossem direcionadas ao fundo evitando perdas. Seguindo a sequência do procedimento, a amostra foi reduzida adicionando-se $2,5\mu\text{L}$ de DTT ($100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Após a redução procedeu-se nova incubação por 30 minutos à temperatura de 60°C e a solução foi resfriada na temperatura ambiente. Novamente procedeu-se o “spin” de um minuto.

Posteriormente a solução foi alquilada adicionando-se uma alíquota de $2,5\mu\text{L}$ de iodoacetoamida (IAA) ($300\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e permaneceu no escuro durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram digeridas com a adição de $10\mu\text{L}$ de tripsina ($50\text{ ng}/\mu\text{L}$) numa proporção de 1:100 (enzima:proteína) homogeneizando gradualmente e incubada a 37° pelo período de 16h.

Após a digestão, o rapigest foi hidrolisado adicionando-se o ácido trifluoracético a 5% e a amostra foi incubada a 37° por 90 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos a 6°C para serem purificadas utilizando-se a coluna Zip Tip antes da análise por ESI-MS/MS.

Na primeira etapa do método de MALDI TOF/TOF não foi utilizada a coluna Zip Tip no preparo de amostras. Os peptídeos das amostras foram dissolvidos diretamente na matriz e aplicados no volume de $1\mu\text{L}$ na placa de inox, própria do

equipamento. Após a secagem da amostra diluída na matriz, a placa foi inserida no equipamento para dar início às análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes toxicológicos

5.1.1. Ensaio preliminar com Cd e Cu

Durante os ensaios a temperatura foi mantida entre 24°C e 26°C, o pH se manteve entre 7,0 e 7,6 (tabela 5) e a dureza estava compreendida no intervalo de 40 e 48 mg CaCO₃/L. Para garantir a qualidade da água, as fezes foram retiradas diariamente pelo método de sucção.

Tabela 5 – Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), pH e biomassa (g/L) dos tratamentos das concentrações ministradas em mg/L-1 durante o experimento preliminar com cádmio

Tratamentos mg L ⁻¹	temperatura	OD	pH	biomassa
Controle A	26,0	6,6	6,7	1,7
Controle B	26,0	7,2	6,7	1,3
0,1 A	26,0	6,8	6,7	1,3
0,1 B	25,0	7,6	6,7	1,4
1,0 A	25,0	7,8	6,8	1,9
1,0 B	25,0	7,9	6,7	1,7
10,0 A	25,0	8,5	6,7	2,4
10,0 B	25,0	9,0	6,8	1,6
100,0 A	26,0	9,1	6,6	1,8
100,0 B	26,0	9,6	6,6	1,9

Para o experimento utilizando o cobre as temperaturas dos aquários variaram de 24 a 25 °C como podemos observar na Tabela 6, o pH se manteve entre 5,4 e 7,4. A dureza estava compreendida no intervalo entre 84,2 e 84,4 mg.L⁻¹ CaCO₃. Como no experimento com cloreto de cádmio, as fezes também foram recolhidas diariamente.

Tabela 6 - Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), pH e biomassa (g/L) dos tratamentos das concentrações ministradas em mg/L-1 durante o experimento preliminar com cobre.

Tratamentos mg L⁻¹	temperatura	OD	pH	biomassa
Controle A	24,3	8,6	7,1	1,4
Controle B	24,3	9,7	7,0	1,5
0,1 A	24,3	10,4	7,1	0,9
0,1 B	24,3	10,0	7,0	1,1
1,0 A	24,3	9,1	7,1	1,2
1,0 B	24,3	9,4	7,1	1,3
10,0 A	24,3	9,5	6,8	0,9
10,0 B	24,3	9,7	6,8	1,5
100,0 A	24,3	10,1	6,0	1,7
100,0 B	24,3	10,6	6,0	1,3

Os resultados apresentados na Tabela 7 são referentes às concentrações de cobre encontradas no tecido muscular, brânquias e fígados das tilápias submetidas a diferentes concentrações de cloreto de cobre. Observa-se que as concentrações encontradas variaram em relação ao tecido analisado e as concentrações a que os organismos foram submetidos.

Tabela 7 - Concentração de cobre em $\mu\text{g/g}$ no tecido muscular, brânquias e fígados de *Oreochromis niloticus* relativas ao ensaio preliminar utilizando CuCl_2 .

Tratamento (mg.L^{-1})	Músculo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Brânquia ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Fígado ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Controle	2,33	14,30	*SA
0,05	3,02	11,43	*SA
0,5	3,67	15,77	*SA
5,0	19,68	*SA	*SA
50,0	61,57	*SA	*SA

*SA – sem amostra

Observa-se no Gráfico 1 que a concentração de cobre no tecido muscular de *Oreochromis niloticus* expostos a CuCl_2 , apresenta uma correlação à concentração do metal dissolvido, constatando a ocorrência de uma acumulação do cobre. Apesar disso, as correlações do Cu no tecido muscular e as respectivas concentrações dissolvidas, ou bioconcentração, apresentou-se mais elevada na menor concentração de Cu dissolvido, atingindo a uma razão de 60,4.

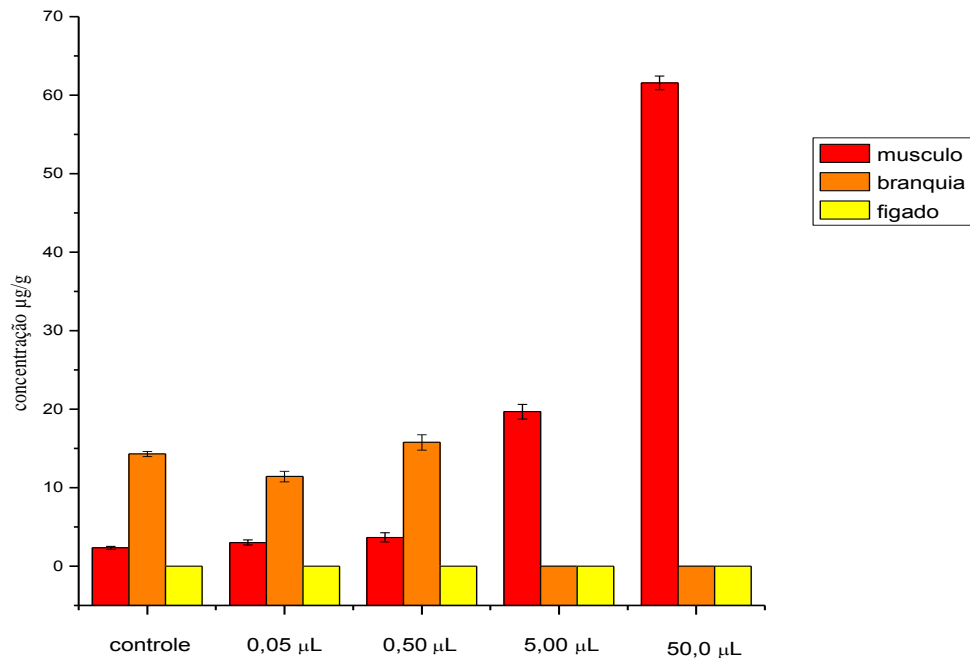


Gráfico 1 - Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ Cu em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, no ensaio preliminar de 48 horas

No outro extremo, a concentração de Cu mais elevada apresentou razão igual a 1,23. Esses dados evidenciam as funções e limitações do organismo como bioindicador, estando esses aspectos diretamente ligados ao tempo de exposição do organismo ao ambiente. Em baixas concentrações o organismo exposto não apresentou respostas significativas em relação a presença do metal. O acúmulo do cobre no tecido muscular da tilápia foi de aproximadamente duas ordens de magnitude, em relação ao tempo de contato. Nas situações de concentrações mais elevadas do metal dissolvido, o tempo de exposição é reduzido pela toxicidade aguda e consequente óbito.

De acordo com nossos resultados, não foi observada a mesma tendência nas brânquias. Embora a concentração de Cu tenha sido mais elevada nas brânquias pertencente ao tratamento de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ Cu do que no tratamento $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ Cu, o

tratamento controle apresentou concentração de Cu mais elevada do que neste último. Não se pode descartar a hipótese de tratar-se de um fato de ocorrência natural, pois o cobre é um elemento químico abundante na natureza e ser de caráter essencial aos organismos.

Nas amostras de brânquias referentes aos tratamentos de 5 mg L⁻¹ Cu e 50 mg L⁻¹ Cu, não foi possível analisar os resultados, pois uma concentração extremamente elevada foi verificada nessas situações. Supõe-se que ocorreu acúmulo externo de soluções do metal, não eliminadas durante o preparo de amostras. Como este órgão é o primeiro a entrar em contato com a solução contaminada, esta se aderiu às entranhas do tecido e ocasionou um resultado que não seria o absorvido e sim adsorvido pelo mesmo.

Contudo, comparando-se as concentrações do cobre no tecido muscular e nas brânquias (Tabela 7), pode-se observar as brânquias apresentam concentrações mais elevadas. Supostamente este fato pode ser explicado tanto por uma distribuição interna ou fisiológica como também pelo fato de a brânquia estar em contato direto com a solução contaminada.

Çoğun et al. (2003) apresentaram em estudo realizado sobre a acumulação de cobre e cádmio em fígado, brânquia e tecido muscular de *Oreochromis niloticus*, que a ordem de acumulação desses metais ocorre na sequência fígado > brânquias > tecido muscular, enfatizando ser esta decrescente para os órgãos citados. Este estudo corrobora com o presente trabalho em que o tecido muscular acumula menos metal se comparado à brânquia. Kamaruzzaman (2010) revelaram em seu estudo sobre acumulação de metais nas brânquias de Tilápia Fingerlings que a exposição desse organismo a concentrações de cobre, zinco e chumbo causa um significativo impacto no órgão em questão.

Do ponto de vista nutricional, um aspecto importante a ser mencionado, diz respeito aos níveis dos xenobióticos presentes no tecido muscular, onde as menores concentrações são encontradas. Haveria restrições mais severas ao peixe como alimento se a população ingerisse órgãos como hábito alimentar.

Dados não são apresentados para o fígado por dificuldades encontradas na aquisição de massa disponível para efetuar-se a análise, estando este cenário relacionado ao próprio tamanho dos espécimes utilizados nos experimentos e ao agravante de o metal induzir necroses ao tecido quando expostos ao metal. Observou-se ainda que o congelamento utilizado como parte da preservação dos organismos-teste antes das dissecações, supostamente dificultava a separação dos fígados após o descongelamento.

A Tabela 8 mostra as concentrações de cádmio em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, encontradas no fígado, brânquias e tecido muscular dos organismos-testes para o ensaio preliminar de CdCl_2 , referentes à digestão ácida utilizando o sistema pressurizado de microondas.

Tabela 8 - Concentração de cádmio em $\mu\text{g.g}^{-1}$ encontradas no tecido muscular, brânquias e fígados de *Oreochromis niloticus* para o ensaio preliminar de CdCl_2 .

Tratamento (mg.L^{-1})	Músculo	Brânquia	Fígado
Controle	< LD	< LD	< LD
0,05	< LD	1,79	6,93
0,5	< LD	4,93	6,33
5	0,91	79,32	12,99
50	33,94	-	47,06

Pode-se observar na Tabela 8 o acúmulo de cádmio no tecido muscular, brânquias e no fígado proporcional ao aumento da concentração do metal dissolvido. De uma maneira geral, verificam-se as baixas concentrações da ocorrência do Cd nos organismos, mesmo em órgãos como brânquia e fígado., Diferentemente do Cu, não foi verificada a acumulação do Cd no tecido muscular para concentrações de até $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ Cd. Acúmulos foram verificados a partir da concentração 5 mg L^{-1} Cd. Para brânquia e fígado a acumulação do metal ocorreu a partir de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ Cd.

Observa-se na tabela 8 uma maior acumulação de cádmio na brânquia em relação ao fígado e ao músculo, principalmente na concentração 5 mg.L^{-1} , enquanto que o músculo apresentou menor acumulação em todas as concentrações em relação aos órgãos estudados.

Nogami (2000) concluiu em estudo realizado sobre o efeito do cádmio na dieta e sua bioconcentração em *Oreochromis niloticus* que houve uma maior acumulação nas vísceras se comparado ao tecido muscular, mostrando uma correlação com os resultados obtidos pelo presente estudo.

Nas brânquias, não foi possível analisar o resultado do tratamento 50 mg.L^{-1} , devido a problemas relacionados ao preparo das amostras, ênfase à lavagem deficiente dos tecidos, assim como aconteceu no preparo de amostras do ensaio preliminar de CuCl_2 .

As concentrações de cobre+cádmio em $\mu\text{g.g}^{-1}$, encontradas no fígado, brânquias e tecido muscular dos organismos-testes para o ensaio preliminar de $\text{CuCl}_2+\text{CdCl}_2$, referentes à digestão ácida utilizando o sistema pressurizado de microondas podem ser observadas na Tabela 9. Nessa tabela também se observa um aumento na acumulação de cobre e cádmio pelo tecido muscular, brânquias e fígado, com o aumento da concentração nas soluções-teste.

Para o cobre nota-se uma acumulação maior no fígado em comparação com a brânquia e tecido muscular, corroborando com estudos encontrados na literatura (GHEDIRA et al., 2008), onde o fígado é o maior acumulador de metais em comparação com brânquias e tecido muscular.

Para o cádmio, pode-se observar que a brânquia apresentou uma maior acumulação em comparação com o fígado e tecido muscular, encontrando resultado semelhante do cádmio na Tabela 8.

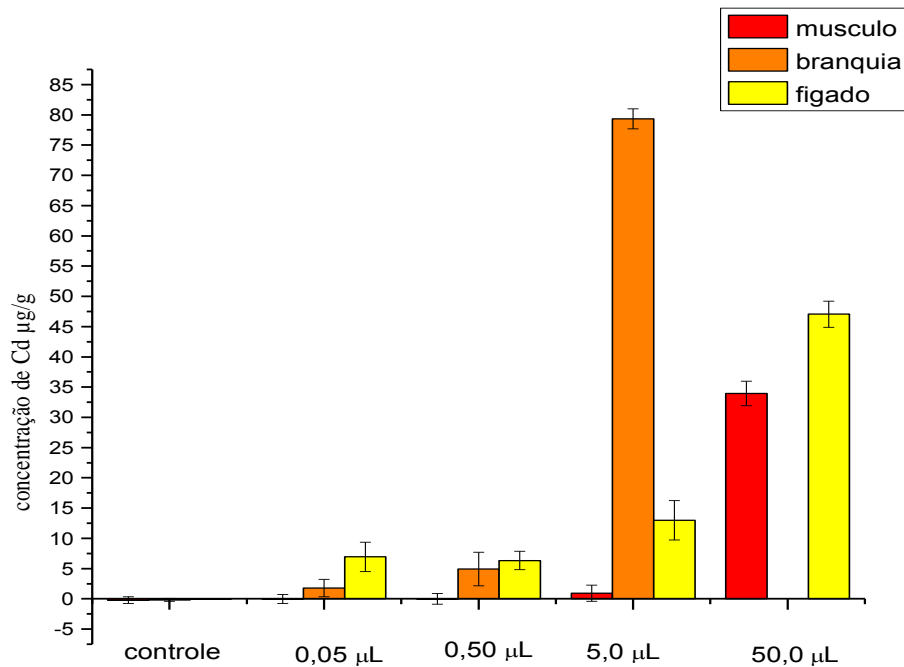


Gráfico 2 - Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, durante o ensaio preliminar de 48 horas

O tecido muscular apresentou tanto no ensaio preliminar de cobre, quanto nos ensaios de cádmio e cobre+cádmio uma menor acumulação dos metais, confirmando com os dados encontrados na literatura (GHEDIRA et al., 2008), onde neste tecido o processo de acumulação ocorre em menor grau .

Tabela 9 - Concentração de cobre+cádmio em $\mu\text{g g}^{-1}$ encontradas no tecido muscular, brânquias e fígados de *Oreochromis niloticus* em ensaio preliminar de $\text{CuCl}_2+\text{CdCl}_2$.

Tratamento (mg.L^{-1})	Músculo		Brânquia		Fígado	
	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd
Controle	1,69	< LD	4,18	1,07	6,46	0,29
0,05	1,89	0,28	5,80	1,91	14,94	3,78
0,5	2,20	< LD	7,60	7,83	19,64	4,98
5,0	10,05	9,31	-	193,69	272,97	64,77
50,0	93,68	121,79	-	-	311,97	167,75

5.1.2. Ensaio de toxicidade aguda

Após os resultados dos testes preliminares, as concentrações a serem testadas nos ensaios de toxicidade aguda com os organismos *Oreochromis niloticus*, foram determinadas.

Para o cobre e a mistura dos dois metais, as concentrações utilizadas no teste definitivo ficaram compreendidas entre $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Controle); $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e para o ensaio definitivo com o cádmio, as concentrações utilizadas foram $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Controle); $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; $5,0 \text{ mg L}^{-1}$; $10,0 \text{ mg L}^{-1}$; $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Na Tabela 10 estão apresentadas a mortalidade dos organismos em porcentagem no período de 96 horas dos ensaios agudos, em função das concentrações de CuCl_2 , $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuCl}_2+\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Tabela 10 – Mortalidade (%) dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*, em função da concentração do metal no teste agudo 96h com Cu, Cd e Cu + Cd

Tratamentos mg L ⁻¹	96 horas		
	Cu.	Cd	Cd + Cu
Controle	10	13,3	0
0,5	3,3	0	30
1,0	23,3	0	26,6
2,5	16,6	0	93,3
5,0	56,6	0	100
10,0	100	3,3	100
25,0		66,6	
50,0		100	

As maiores porcentagens de mortalidade dos organismos nos ensaios agudos com cobre e cobre + cádmio foram verificadas nas concentrações de e 10,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ para os tratamentos com cobre e para a mistura cobre + cádmio respectivamente (Tabela 10).

Para o ensaio com Cu porcentagens entre 56,6 e 100% de mortalidade dos organismos-teste foram verificadas nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ respectivamente em um período de 96 horas de experimentação. Para o ensaio agudo com Cu + Cd ocorreram 100% de mortalidade dos organismos em ambas as concentrações no mesmo período de experimentação, evidenciando a potencialização tóxica dos metais quando utilizados em mistura, o que denominamos sinergismo.

Para o ensaio agudo com cloreto de cádmio observou-se que a maior concentração testada, 50,0 mg L⁻¹, apresentou 100% de mortalidade dos organismos-teste em 96 horas de experimentação.

Os resultados mostraram que os ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio exibiram maior toxicidade à espécie em estudo que o ensaio com cloreto de cádmio, reforçando a validade dos ensaios preliminares discutidos anteriormente. Esta tendência pode ser confirmada pelas concentrações

letais médias (CL₅₀) encontradas no período de 96 horas para os ensaios agudos com os referidos metais.

Com base nas porcentagens de mortalidade obtidas em cada uma das concentrações dos ensaios agudos com cobre, cádmio e cobre + cádmio, as CL₅₀-96h foram estimadas utilizando-se o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1978).

Através deste protocolo, as concentrações letais medianas encontradas foram 3,53 mg L⁻¹ com intervalo de confiança de 95%; 20,13 mg L⁻¹ com intervalo de confiança de 95% e 1,36 mg L⁻¹ com intervalo de confiança de 95% para os ensaios com cobre, cádmio e cobre + cádmio respectivamente.

Os resultados são indicativos da ocorrência de acúmulo de metais nos tecidos, principalmente fígado e brânquias, tanto para cobre (Tabela 11) como para cádmio (Tabela 12). Esse padrão de comportamento pode estar indicando, por exemplo, que esta espécie apresenta grande capacidade de desintoxicação e capacidade de bioacumulação comparada a outras espécies como a *O. mossambicus*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*. (GARCIA-SANTOS et al., 2006).

Tabela 11 - Concentração de cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, durante o ensaio agudo de 96 horas

Tratamentos mg L ⁻¹	Músculo		Brânquias		Fígado	
	valor	SD	valor	SD	valor	SD
Controle	0,35	0,01	1,21	0,80	4,22	1,40
0,50	0,82	0,03	3,80	0,24	28,27	0,00
1,00	1,01	0,05	3,34	0,15		
2,50	1,09	0,22	4,43	0,31	46,06	0,00
5,00	1,40	0,14	7,40	0,01		
10,00	3,34	0,23	296,45	1,20	129,15	0,00

Tabela 12 - Concentração de cádmio ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, para o ensaio de toxicidade aguda de 96 horas.

Tratamentos mg L^{-1}	Músculo		Brânquias		Fígado	
	valor	SD	valor	SD	valor	SD
Controle	0,01	0,00	0,09	0,06	0,43	0,15
1,00	0,18	0,01	0,80	0,03	13,05	2,03
5,00	0,66	0,32	2,41	0,32	19,44	0,00
10,00	0,31	0,03	4,37	1,29	14,99	3,80
50,00	0,84	0,05	160,40	7,92		

A partir de seus estudos, Garcia-Santos et al. (2006) estimaram a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ de cádmio em uma dureza total de $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, em *Oreochromis niloticus* de $14,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}$. Os autores afirmam que essa espécie não se mostra adequada para avaliar a toxicidade subletal de cádmio devido à alta tolerância da espécie a esse metal, mas que certamente pode contribuir significativamente para o entendimento do mecanismo tóxico do cádmio em organismos aquáticos.

Almeida et al. (2001) determinaram a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ do Cloreto de Cádmio (CdCl_2) em *Oreochromis niloticus*. O valor apresentado pelos autores foi $18,58 \text{ mg L}^{-1}$, muito próximo do valor encontrado no presente trabalho.

Masutti et al. (2006) estudaram a sensibilidade de *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes* a cobre e cromo. Os autores determinaram valores de $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para o cobre e para a espécie *Oreochromis niloticus* variando de $0,32 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ e concluíram que ambas as espécies apresentaram maior sensibilidade ao cobre do que ao cromo.

Os estudos citados anteriormente e os resultados apresentados pelo trabalho em questão mostram que a espécie *Oreochromis niloticus* é mais sensível ao cobre do que ao cádmio. Esse dado justifica a maior taxa de mortalidade ocorrida nos

experimentos com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio que nos ensaios com cloreto de cádmio.

A temperatura nos ensaios definitivos com CuCl_2 , $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuCl}_2 + \text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ficou compreendida entre $24^\circ\text{C} \pm 1$, o oxigênio dissolvido permaneceu no intervalo entre $6,77\text{mg L}^{-1}$ a $8,83\text{mg L}^{-1}$ e o pH entre 6,50 a 7,74.

Nos experimentos as variáveis pH, temperatura e concentração de oxigênio mantiveram-se sem variações significativas, tanto entre as diferentes concentrações quanto entre as suas réplicas, reduzindo assim a possibilidade de mortalidade devido a variações bruscas nas qualidades físico-químicas da água utilizada nos testes no período de 96 horas.

5.1.3. Bioconcentração de Cobre e Cádmio

Fator de bioconcentração (FBC) é um termo usado para quantificar a tendência que um composto apresenta de se concentrar em organismos aquáticos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O FBC é uma constante de proporcionalidade que corresponde à razão entre a concentração do composto no organismo e sua concentração na água (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Esse fator deve ser estimado com base nas concentrações efetivas do composto na água.

$$\text{FBC} = \frac{\text{Concentração do composto no organismo}}{\text{Concentração efetiva do composto na água}}$$

As concentrações de cobre e cádmio foram determinadas no fígado, brânquias e tecidos musculares dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*. Estes valores foram referentes aos experimentos com metais diluídos em água no ensaio preliminar e teste de toxicidade aguda.

A curva analítica para Cd e Cu foi construída com 05 pontos, 0,0 mg L⁻¹, 0,10 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹.

Os limites de detecção para as análises dos órgãos dos ensaios preliminares com cobre e cádmio foram respectivamente 1,55 µg L⁻¹ e 1,94 µg L⁻¹ e para o ensaio preliminar com cobre + cádmio foram para o cobre e cádmio respectivamente 1,05 µg L⁻¹ e 1,53 µg L⁻¹.

Para os ensaios agudos os limites de detecção para o cobre e para o cádmio foram 0,81 µg L⁻¹ e 1,67 µg L⁻¹ respectivamente. Todos esses limites foram estabelecidos a cada campanha analítica. Os resultados das análises de bioconcentração nos órgãos foram expressos em µg g⁻¹ com base no peso úmido das respectivas amostras.

Em alguns trabalhos citados na literatura referentes a bioacumulação de metais em peixes observa-se um padrão de acúmulo semelhante ao verificado no presente trabalho onde a maior concentração se encontra no fígado seguido das brânquias e por último o músculo (KOJADNOVIC et al., 2007; BEGUM et al., 2012).

A Tabela 13 refere-se à bioconcentração de cobre no tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, encontrados através do ensaio preliminar de CuCl₂.

Tabela 13- Bioconcentração de cobre, referente ao ensaio preliminar com Cu, no tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, digeridos em sistema pressurizado de microondas

Tratamentos (mg.L⁻¹)	Músculo (µg.g⁻¹)	Brânquia (µg.g⁻¹)	Fígado (µg.g⁻¹)
0,05	60,47	228,55	SA
0,50	7,34	31,54	SA
5,00	3,94	SA	SA
50,00	1,23	SA	SA

SA –sem amostra

Observando a Tabela 13, nota-se que conforme aumenta a concentração do metal na solução, a bioacumulação no tecido muscular, brânquias e fígado diminuem. Boock e Neto (2000) encontraram resultado semelhante para a bioconcentração de cobre em Tilápia Vermelha, onde verificaram maior acúmulo de cobre nos organismos expostos a menores concentrações. Os autores explicam este fato pela formação de muco nos filamentos branquiais dos organismos e a maior imobilização do cobre, resultando em menor absorção no músculo dos peixes.

Esse resultado no presente trabalho também pode ter acontecido devido ao tempo de exposição à solução contaminada, conforme comentado anteriormente neste texto, visto que nas maiores concentrações ocorreu um número maior de óbitos antes de completada às 48 horas e pelo fato da influência da salinidade sobre a bioconcentração dos metais nos tecidos e órgãos do organismo-teste. À medida que aumenta a concentração dos metais na solução-teste, a salinidade também aumenta, De acordo com Zagato e Bertolletti (2008), a salinidade afeta a bioconcentração através de seus efeitos sobre os processos físico-químicos e fisiológicos (osmoregulação), porém a influência da salinidade sobre a bioconcentração de metais é mais complexa e específica para cada elemento. Para o cobre, a assimilação é errática e especialmente afetada pela complexação orgânica e a de cádmio é inversamente proporcional à salinidade.

Pode-se verificar tendência semelhante aos resultados apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15 onde se observa à bioconcentração de cádmio e cobre+cádmio

no tecido muscular, brânquias e fígado, digeridas em sistema pressurizado de microondas, do organismo-teste *Oreochromis niloticus*, referente ao ensaio preliminar de CdCl₂ e CuCl₂+CdCl₂ respectivamente,

Tabela 14 - Bioconcentração de cádmio em µg.g⁻¹, referente ao ensaio preliminar de Cd, no tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, digeridos em sistema pressurizado de microondas

Tratamentos (mg.L⁻¹)	Metal	Músculo	Brânquia	Fígado
0,05	Cd		35,83	138,58
0,50	Cd		9,85	12,66
5,00	Cd	0,18	15,86	2,60
50,00	Cd	0,68		0,94

Tabela 15 - Bioconcentração de cobre+cádmio em µg.g⁻¹, referente ao ensaio preliminar de Cu+Cd, no tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*, digeridos em sistema pressurizado de microondas

Tratamentos (mg.L⁻¹)	Músculo		Brânquia		Fígado	
	Cu	Cd	Cu	Cd	Cu	Cd
0,05	37,85	5,54	116,03	38,13	298,90	75,63
0,50	4,39		15,19	15,66	39,28	9,95
5,00	2,01	1,86		38,74	54,59	12,95
50,00	1,87	2,44			6,24	3,35

Observa-se na Tabela 14 que apenas o tecido muscular apresentou um pequeno aumento na bioconcentração, resultado diferente do ocorrido dos outros apresentados, porém semelhante do que é encontrado na maioria dos trabalhos existentes na literatura.

As Tabelas 16, 17 e 18 mostram os fatores de bioconcentração para cobre e cádmio em concentrações dos ensaios de toxicidade aguda (96 h) de cobre, cádmio e cobre + cádmio. À semelhança dos ensaios preliminares, os cálculos foram também baseados em peso úmido da amostra.

Tabela 16 – Fator de bioconcentração do cobre para o tecido muscular, brânquias e fígado dos organismos avaliados durante o ensaio agudo (96 h) com CuCl_2

tratamento mg L ⁻¹	Músculo		Brânquias		Fígado	
	valor	SD	valor	SD	valor	SD
0,5	1,62	0,14	7,38	0,77	77,74	34,51
1,0	1,04	0,03	2,82	0,40		
2,5	0,34	0,03	1,71	0,15	24,83	9,58
5,0	0,25	0,02	1,40	0,06		

Tabela 17 – Fator de bioconcentração do cádmio para o tecido muscular, brânquias e fígado dos organismos avaliados durante o ensaio agudo (96h) com Cd.

Tratamento mg L ⁻¹	Músculo		Brânquias		Fígado	
	valor	SD	valor	SD	valor	SD
10,0	0,03	0,00	0,45	0,13	1,53	0,42
50,0	0,02	0,00	3,46	0,20	-	-

Tabela 18 – Fator de bioconcentração de cobre+cádmio para o tecido muscular, brânquias e fígado dos organismos avaliados durante o ensaio agudo com $\text{CuCl}_2+\text{CdCl}_2.\text{H}_2\text{O}$

Tratamento	Musculo		Brânquias		Fígado	
	valor	rsd	Valor	rsd	Valor	rsd
0,5 mg L ⁻¹						
Cd	0,07	0,00	2,11	0,06	6,95	0,32
Cu	0,98	0,01	3,00	0,39	27,52	1,05

O fator de bioconcentração de cobre e cádmio para o tecido muscular, de acordo com as tabelas acima apresentadas, mostrou-se menor tanto para os ensaios preliminares quanto para os ensaios agudos.

Observou-se para o cobre, em comparação com o cádmio, um fator de bioconcentração maior em todos os órgãos, para os ensaios preliminares e agudos. Esse resultado relaciona aos resultados mostrados anteriormente sobre a acumulação do cobre e cádmio. Estes mostram que a concentração do cobre foi maior nos organismos que a do cádmio.

Bu-Olayan et al. (2008) encontraram em seus estudos sobre a acumulação de cádmio, cobre, ferro e zinco na espécie marinha *Periophthalmus waltoni* uma relação diferente da encontrada na presente pesquisa. A sequência encontrada pelo autor para o fator de bioconcentração sendo $\text{Cd} > \text{Fe} > \text{Cu} > \text{Zn}$.

5.1.4. Injeção intraperitoneal

É possível observar nas Tabelas 19 e 20 a semelhança das amostras obtidas nos ensaios dos metais dissolvidos, o tecido muscular, o fígado, as guelras, foram solubilizados em meio ácido HNO_3 . Neste caso foram empregados sistemas fechados em bombas de Teflon aquecidas a 60 °C e também foi utilizado o sistema pressurizado em forno de microondas.

Tabela 19 - Teores médios de ocorrência natural de Cu e Cd em fígado, brânquias e músculo de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 19 g. Solubilização em ácido nítrico 67% e H₂O₂. Digestão em bomba de teflon 60°C, sistema fechado, experimento (A)

Órgão	Cu		Cd	
	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD
Fígado (n=1)	1,782	0,000	0,148	0,000
Brânquias (n=2)	6,255	1,404	0,467	0,028
Músculo (n=2)	2,495	0,108	0,234	0,002

Tabela 20 – Teores médios de Cu e Cd em fígado, brânquias e músculo de Tilápias (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 21 g, submetidos à injeção intraperitoneal contendo solução de Cu. Solubilização de amostras em ácido nítrico 67% e H₂O₂. Digestão em microondas, experimento (A)

Órgão	Cu		Cd	
	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD
Fígado (N=1)	1,568	0,000	0,127	0,000
Brânquias (N=3)	11,412	3,276	1,416	0,123
Músculo (N=2)	4,097	1,160	1,095	0,269

De uma forma geral os resultados presentes na Tabela 19 foram mais elevados tanto para Cu, como para Cd, indicando uma maior eficiência do processo de solubilização no forno de microondas.

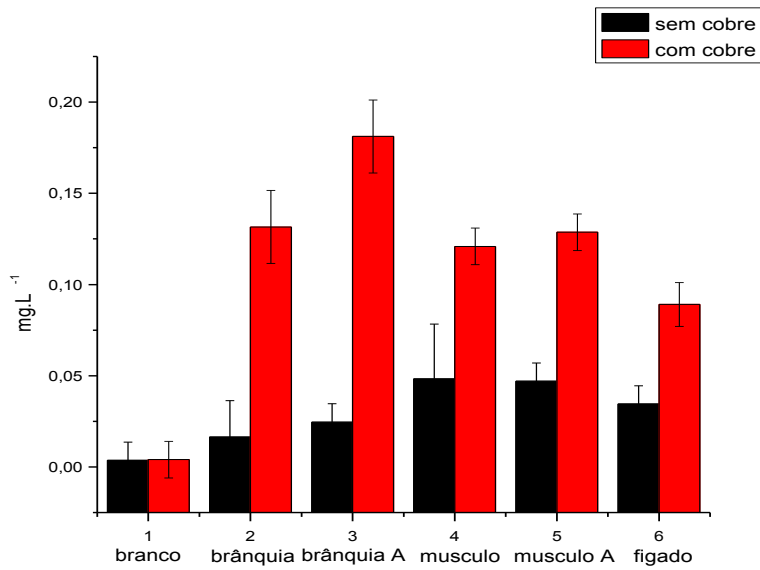


Gráfico 3 – Distribuição do Cu ($\mu\text{g/g}$) em *O. niloticus*, experimento com injeção intraperitoneal (A).

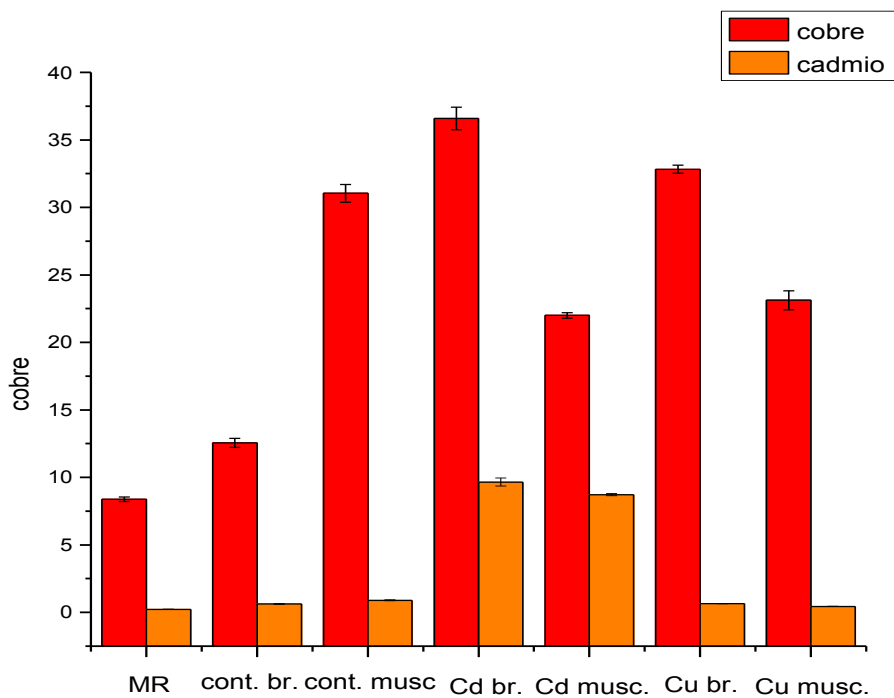


Gráfico 4 – Distribuição do Cd e Cu ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em *O. niloticus*, experimento com injeção intraperitoneal (B)

As maiores concentrações dos elementos foram observadas nas brânquias, seguido do tecido muscular e fígado (Gráfico 3). A literatura cita alguns trabalhos referentes à bioacumulação de metais em peixes que apresentam, de forma geral, resultados no que se refere à razão de entrada de íons metálicos, que tendem a ser maior no fígado quando comparado a outras estruturas (KOJADINOVIC et al., 2007), como o músculo. Os resultados de IP (A) e (B) se mostraram semelhantes à literatura no que diz respeito à bioacumulação ser menor no músculo do que nos outros órgãos estudados. Também se observou uma semelhança em relação aos ensaios com metais dissolvidos na água que também apresentaram menor bioacumulação no músculo.

No experimento (B) o mesmo padrão se repetiu e os teores tanto de cádmio como de cobre foram maiores nas brânquias do que nos músculos (Tabela 20).

Tabela 21 - Teores médios de Cu e Cd em fígado, brânquias e músculo de Tilápias (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 21 g, submetidos à injeção intraperitoneal contendo solução de Cu. Solubilização de amostras em ácido nítrico 67% e H₂O₂. Digestão em microondas, experimento (B)

Amostras	Cobre		Cádmio	
	Média	Desvio	Média	Desvio
MR	8,3785	0,161	0,231	0,009
Controle brânquia	12,56	0,3335	0,619	0,0275
Controle músculo	31,04	0,665	0,8965	0,034
Cádmio músculo	36,58	0,8355	8,654	0,2975
Cádmio brânquia	22,005	0,2025	9,7245	0,082
Cobre músculo	32,82	0,3005	0,6505	0,0075
Cobre brânquia	23,12	0,699	0,445	0,017

Foi observado no experimento com as injeções intraperitoneais que os peixes não sofrem um estresse significativo apesar da manipulação, devido à sedação que evita que o mesmo se debata e facilita a operação tornando-a bem rápida e simples. Durante esta pesquisa não houve nenhuma perda que pudesse ser relacionada ao processo de injeção intraperitoneal e nos testes preliminares com a IP não foram verificados óbitos devido ao volumes aplicados nos peixes.

Desta forma observou-se que são muitas as vantagens do uso da injeção intraperitoneal, a qual simplifica o ensaio, além de evitar a produção de elevada quantidade de efluentes e também evita a contaminação das cubas experimentais.

5.2. Extração e purificação das proteínas

O protocolo de Viarengo (1997) foi desenvolvido para extração de metalotioneínas em glândulas digestivas de ostras e adaptado para várias espécies. Nesta pesquisa, este método apresentou bons resultados para purificação das metalotioneínas em brânquias e fígados de Tilápias do Nilo. Algumas modificações foram feitas para adaptação as condições do laboratório onde foi desenvolvida a pesquisa. Entre elas o tempo da primeira centrifugação que foi satisfatória com 60 min a 20.000 x g, um valor intermediário entre os dois apresentados pelo protocolo adotado.

Foi possível a visualização de bandas suficientemente nítidas nas Figuras 6 e 7 (citadas no item 5.4.1), referentes a fígado e brânquias na faixa de 6,5 KDa, que é a massa esperada para as metalotioneínas. Este resultado mostra que o procedimento de purificação parcial das metalotioneínas é bem satisfatório para os tecidos fígado e brânquias de *O. niloticus*.

Para tanto, as amostras foram preparadas sob condições redutoras utilizando β -mercaptoetanol 0,01%, evitando a formação de produtos de maior massa molecular (>20 kDa). Isto pode ocorrer devido à oxidação da metalotioneína através da formação de pontes de sulfeto durante a etapa de purificação.

No músculo os poços 6 e 8 da Figura 5 e poços 6 e 8 da Figura 6 (citadas no item 5.4.1), revelam a presença de bandas de proteínas em outras faixas de peso acima de 6,5 KDa. Isto implica na presença de outras proteínas interferentes que não foram devidamente excluídas no processo de purificação proposto por Viarengo et al. (1997), possivelmente houve a formação de pontes de sulfeto na purificação deste tecido.

Na tabela 30 temos os resultados do teor de proteínas totais obtido pelo método de Bradford (1976). Pode-se observar os maiores níveis de proteínas no músculo seguido das brânquias e por fim os fígados.

Tabela 22 - Teor de proteínas totais em mg/ml no citosol de brânquias e músculos de tilápias (*Oreochromis niloticus*)

Amostra	Teor de proteína total
	mg/ml
Controle A (fígado)	3,25
Controle B (fígado)	5,12
Controle A (brânquia)	8,85
Controle B (brânquia)	9,22
Cu A (brânquia)	6,94
Cu B (brânquia)	9,92
Cd A (brânquia)	6,78
Cd B (brânquia)	6,09
Controle A (músculo)	11,83
Controle B (músculo)	8,64
Cu A (músculo)	10,82
Cu B (músculo)	9,12
Cd A (músculo)	9,28
Cd B (músculo)	8,06

5.3. Eletroforese

5.3.1. Géis de poliacrilamida

Inicialmente foram testadas duas concentrações de gel para observar a eficiência da migração das proteínas em diferentes porosidades, com objetivos de otimizar a visualização de bandas de baixo peso molecular. Schagger e Von Jagon (1987) propuseram em sua pesquisa a utilização de 3 porosidades de gel (16,5%, 10%, 4%) para visualização de bandas KDa. Nesta pesquisa, sendo as massas moleculares de interesse entre 6 e 14 KDa foram testadas apenas duas concentrações (16,5% e 12,5%) (Figuras 10 e 11).

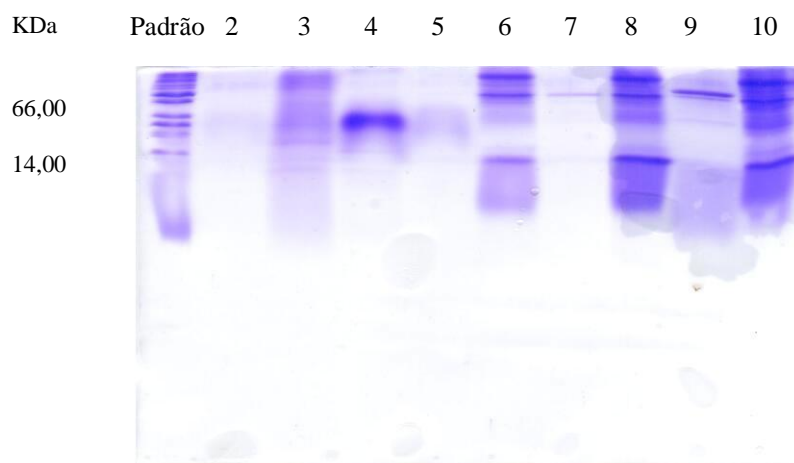


Figura 11 – Imagem de gel obtido por SDS-PAGE 16,5%T, 3%C contendo extratos de MT fígado de coelho, MT de brânquias e músculos de Tilápias

A Figura 11 mostra o gel, composto de poliacrilamida, com concentração de 16,5%, obtido para os extratos das amostras de brânquias e músculos de *Oreochromis niloticus* submetidas às injeções intraperitoneais de soluções descritas anteriormente, as quais resultaram em concentrações de 150 μ L de solução a 20 mg.L⁻¹ e 300 μ L de solução a 20 mg.L⁻¹ de ⁶⁵Cu. Este gel contém 10 colunas numeradas de 1 a 10. Nos poços 2, 3, 4 e 5 estão presentes as bandas referentes ao padrão de MT purificada de fígado de coelho. Os poços 6, 8 e 10 são relativos às bandas obtidas de extratos de brânquias de tilápias submetidas ao tratamento com injeção intraperitoneal, nas doses 150 μ L de solução a 20 mg.L⁻¹ e 300 μ L de solução a 20 mg.L⁻¹ de ⁶⁵Cu respectivamente.

Observou-se na Figura 11 uma leve diferença na intensidade da coloração das bandas do gel à medida que a concentração de ⁶⁵Cu a que os peixes foram submetidos aumentou. Possivelmente a concentração de MTs está relacionada ao aumento às doses de ⁶⁵Cu a que os peixes foram submetidos. Em peixes, os mecanismos de desintoxicação de metais possivelmente tóxicos tendem a ocasionar um aumento da concentração das metalotioneínas (VIARENGO, 1989). Rodriguez – Cea (2006) observou em sua pesquisa com duas espécies de peixes que houve um aumento nas concentrações de MT nos extratos de citosol hepático a medida que se aumentava o teor de Cd.

O mesmo padrão de intensidade na coloração do gel pode ser observado na Figura 12 que mostra um gel de eletroforese de concentração 12,5% de acrilamida, obtido para os extratos das amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápia submetida a injeção intraperitoneal de solução de ^{111}Cd e NaCl 0,6% em duas concentrações diferentes e controle.

A primeira dose da solução de ^{111}Cd foi 150 μL de solução a 20 mg.L^{-1} e a segunda 300 μL de solução a 20 mg.L^{-1} de ^{111}Cd . Este gel representado pela Figura 12 apresenta 9 colunas numeradas de 1 a 9. No poço 1 temos as bandas referentes ao padrão que contém proteínas de massa molecular conhecida. Foram aplicados 10 μl de amostras com teor de proteína de 1 mg/ml em todos os poços. No poço 2 foi inserida a amostra de fígado controle. Nos poços 3, 5 e 7, foram aplicadas as amostras de brânquia controle, 150 μL de solução a 20 mg.L^{-1} de ^{111}Cd e a segunda 300 μL de solução a 20 mg.L^{-1} de ^{111}Cd respectivamente. As amostras de músculo foram aplicadas nos poços 4, 6 e 8 que correspondiam a controle, menor dose de Cd e maior dose de Cd. Por fim no poço 9 foi aplicada amostra de BSA como controle da qualidade do gel. Observou-se na Figura 12 a formação da MT nos diferentes tecidos, fígado (poço 2), brânquia (poços 3, 5 e 7) e músculo apenas no poço 8. Observou-se uma diferença na intensidade da cor referente às variações nas doses de Cd inseridas nos animais. A cor mais intensa é referente a maior dose de Cd. Foi possível observar que nas menores doses de Cd, não houve a formação da MT no tecido muscular.

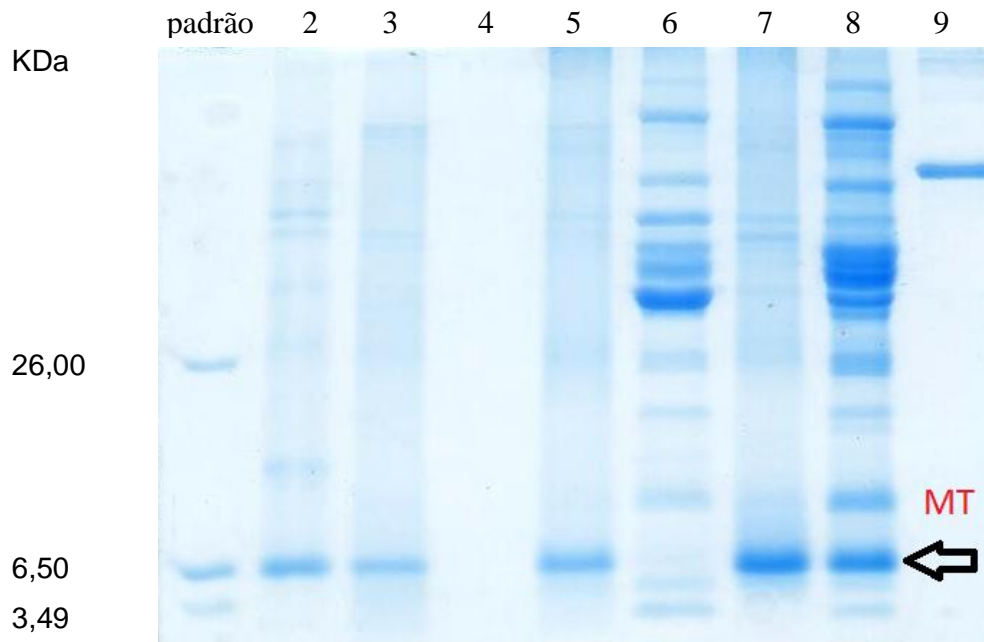


Figura 12 – Gel obtido por SDS-PAGE 12,5%T, 3%C contendo amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo submetidas a diferentes doses de injeção intraperitoneal de ^{111}Cd solubilizado em NaCl 0,6%

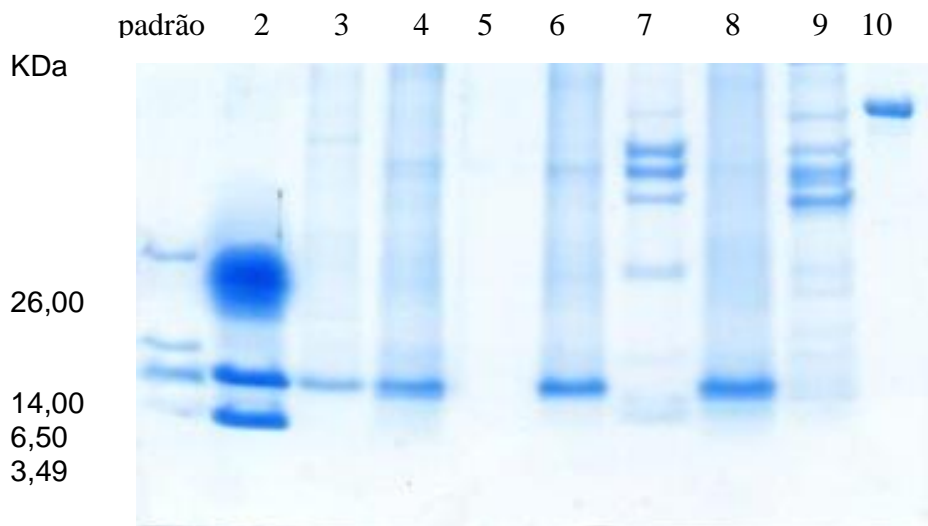


Figura 13 – Gel obtido por SDS-PAGE 12,5%T, 3%C contendo amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo submetidas a diferentes doses de injeção intraperitoneal de ^{65}Cu solubilizado em NaCl 0,6%

Os resultados do gel SDS-PAGE obtido para os extratos de fígado submetidos ao protocolo de extração proposto por Viarengo e colaboradores (1997)

são demonstrados na Figura 13. Neste gel foram apresentadas 9 colunas numeradas de 1 a 9. No poço 1 foi aplicado o padrão de baixo peso molecular cujas proteínas tem massa molecular conhecida. Em seguida no poço 2 foi aplicada MT purificada de fígado de coelho. No poço 3 foi aplicada amostra de BSA, no poço 4 foi aplicada amostra de MT extraídas de 2 unidades de fígado, no poço 5 as MTS foram extraídas de 4 unidades, no poço 6 foram extraídas MTs de 6 unidades de fígado, nos poço 7 foram utilizadas na extração de 8 unidades de fígado, no poço 8 foram aplicadas amostras de MTs extraídas de 10 unidades de fígado e finalmente no poço 9 foi aplicado o amostra extraída de apenas uma brânquia de tilápia que sofreu o tratamento com injeção intraperitoneal na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ^{65}Cu .

Não foi observada uma diferença significativa entre as unidades de fígado (Figura 14). É provável que a pequena diferença observada esteja relacionada à quantidade de proteínas específicas na faixa de peso pesquisada e não a quantidade de fígados, visto que os fígados apresentam grandes diferenças entre os tamanhos e peso mesmo em animais com peso corporal semelhante. Na situação de 10 fígados, obteve-se uma visualização melhor da banda de interesse (6,5 KDa), entretanto pode-se observar resultado semelhante na situação de 2 fígados. Assim, foi estabelecido o emprego de 4 fígados, pois seria uma quantia intermediária e mostrou-se suficiente para a condução dos ensaios.

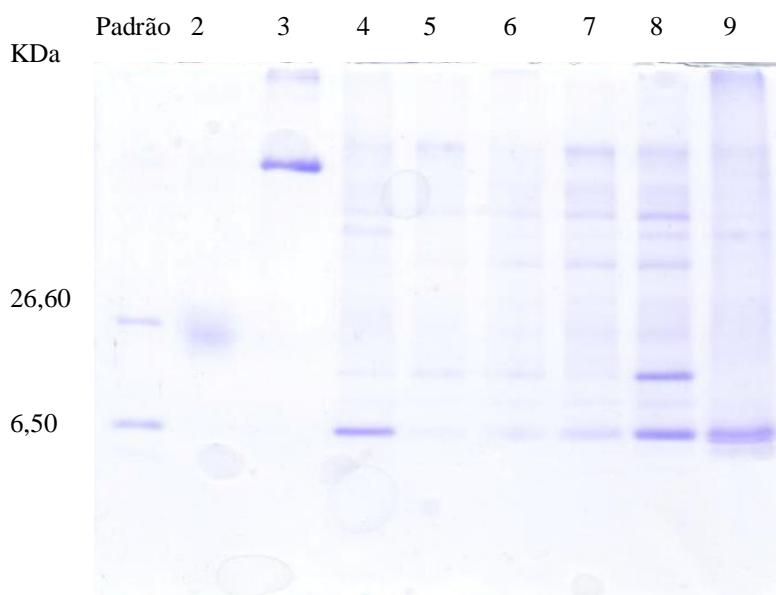


Figura 14 – Imagem de gel obtido por SDS-PAGE 12,5%T, 3%C, contendo extratos de amostras de diferentes quantidades de fígado de Tilápia do Nilo

Os resultados demonstram a efetiva performance da eletroforese SDS PAGE na separação de proteínas extraídas e presentes no citosol dos diferentes tecidos estudados. Ficou patente também neste trabalho que a concentração 12,5% em poliacrilamida mostrou-se superior àquela inicialmente utilizada na concentração 16,5%. Nessa situação excelentes separações de bandas com alta resolução foram observadas e o método também permite estimar que os diferentes tecidos apresentem respostas diferentes quanto à produção das MTs, pois a coloração mostrou-se mais intensa nos fígados, seguido das brânquias e finalmente no tecido muscular. Quando considerado um mesmo órgão ou tecido, as respostas foram também “quantitativas”, à medida que quanto maior a dose considerada, maior a produção de MTs. Na verdade sabe-se que se trata de um método qualitativo, o qual pela resolução apresentada na separação das bandas possibilita o recorte dos géis e a consequente determinação dos metais de interesse, pela extração/solubilização ácida dos metais que caminharam junto a essas proteínas.

Deste modo, após a visualização das bandas, a digitalização dos géis, estas foram cortadas e destinadas a duas análises diferentes. A primeira foi destinada a medir a razão isotópica do $^{111/110}$ Cd e do $^{65/63}$ Cu por ICP-MS e a segunda a digestão em gel para subsequente análise em espectrômetro de massa (ESI-MS).

Os resultados obtidos por ICP-MS indicam uma razão isotópica variando de acordo com a dose. Para as IPs de 150 µL em brânquias e nos músculos, os valores foram mais baixos do que para as IPS de 300 µL para cobre. Para Cd não foi possível realizar os testes devido a perda de amostras no momento do preparo. Quanto aos órgãos foram visualizadas bandas somente em brânquias e músculos, os fígados não apresentaram amostras o suficiente para realização desta análise (Tabela 23).

Tabela 23 - Razões isotópicas de $^{65/63}\text{Cu}$ do citosol extraído dos tecidos brânquia e músculo de *O. niloticus* submetidas a doses de 150 e 300 µL de solução de ^{65}Cu em 0,6% de NaCl referentes as bandas recortados dos géis de SDS-PAGE

^{65}Cu	Brânquia		Músculo	
	Média	Desvio	Média	Desvio
Controle	0,53635	1,053	0,52998	0,48559
IP 150 µL	0,55479	1,267	0,53731	1,643414
IP 300 µL	0,63993	0,647	0,57827	3,072094

5.3.2. Eletroforese capilar

A separação das MTs do citosol extraídos de brânquias (Figura 14), músculos (Figura 15) e fígado (Figura 16) de *O. niloticus* apresentam sinais com tempo muito próximos de migração, em torno de 10 min, bem semelhante ao relatado por Alvares-Llamas (2001) em um estudo de separação de MTs de coelho no qual obtiveram tempo de migração de 12 minutos. Minami et al. (1998) encontraram em sua pesquisa o tempo de migração, para MTs de fígado de coelho, em torno de 10 minutos utilizando capilares recobertos.

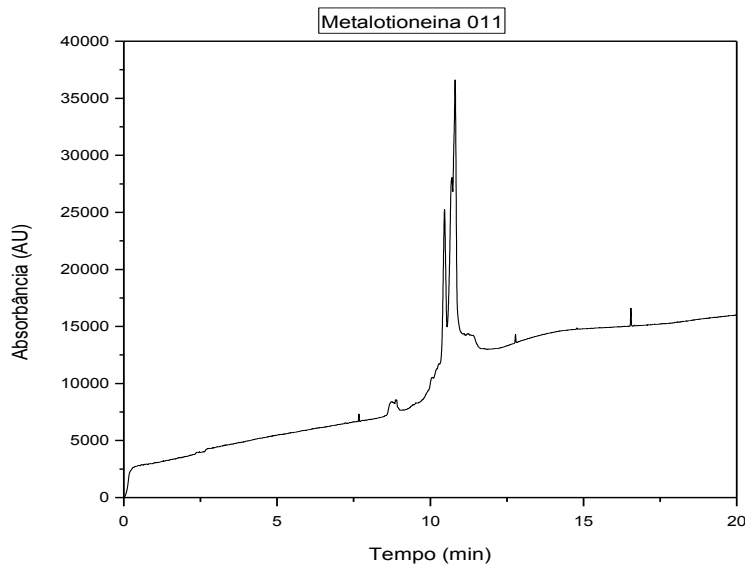


Figura 14 – Eletroferograma da separação das MTs do citosol de brânquias de *O. niloticus* empregando-se tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) e capilar 70 cm. Corrente empregada de 20 kV e comprimento de onda empregado de 200nm

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que as MTs dos tecidos estudados de *O. niloticus* apresentam apenas duas isoformas. Pode-se observar igualmente um comportamento muito semelhante entre os tecidos elegidos. Este fato pode estar relacionado com o preparo dos extratos os quais seguiram o mesmo padrão utilizando-se os mesmos reagentes e concentrações.

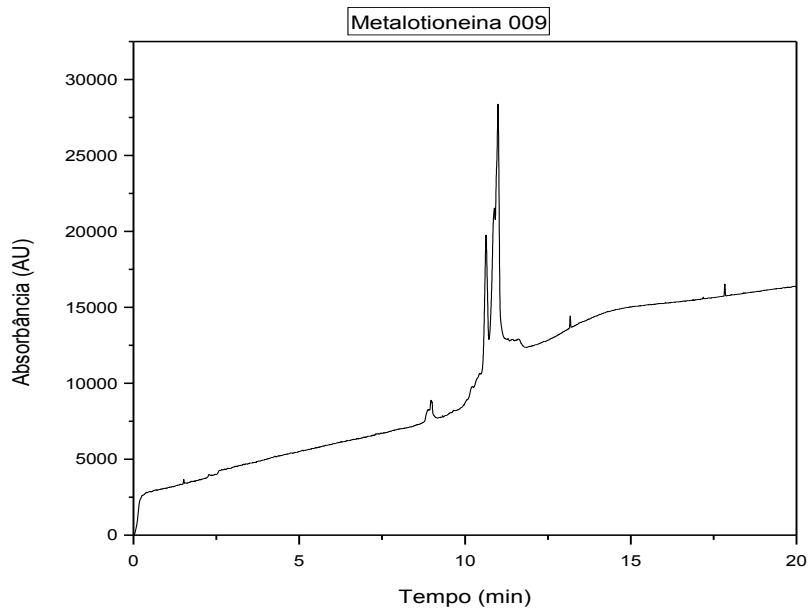


Figura 15 - Eletroferograma da separação das MTs do citosol demúsculo de *O. niloticus* empregando-se tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) e capilar 70 cm. Corrente empregada de 20 kV e comprimento de onda empregado de 200nm

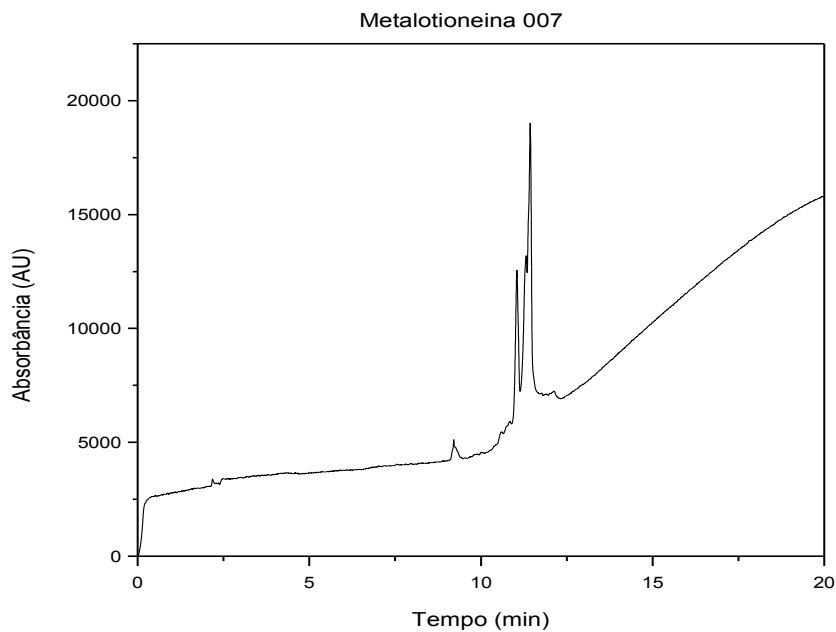


Figura 16 - Eletroferograma da separação das MTs do citosol de brânquias de *O. niloticus* empregando-se tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) e capilar 70 cm. Corrente empregada de 20 kV e comprimento de onda empregado de 200nm

5.4. Marcadores isotópicos

Para rastrear a excreção do metal e deste modo monitorar a desintoxicação do Cd e do Cu em *O. niloticus* utilizou-se os isótopos estáveis ^{111}Cd e ^{65}Cu que foram inseridos nos peixes por injeções intraperitoneais como descrito anteriormente. Para tanto, foram retiradas amostras dos compartimentos que participaram do ciclo do metal desde a injeção intraperitoneal até o abate dos peixes. A verificação da translocação destes metais em órgãos que participam do mecanismo biológico de desintoxicação e/ou acumulação foi obtida pela medida da razão isotópica de $^{111}\text{Cd}/^{110}\text{Cd}$ e de $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$.

Os resultados observados nas Figuras 17 e 18 que para Cd revelam que houve um enriquecimento do isótopo marcado ^{111}Cd em relação ao controle. Esta informação confirma que o cádmio presente nas amostras entrou no organismo através da injeção intraperitoneal e este se deslocou no interior dos organismos pelo período de 7 dias vindo a acumular-se nas brânquias, e em menor quantidade, nos músculos.

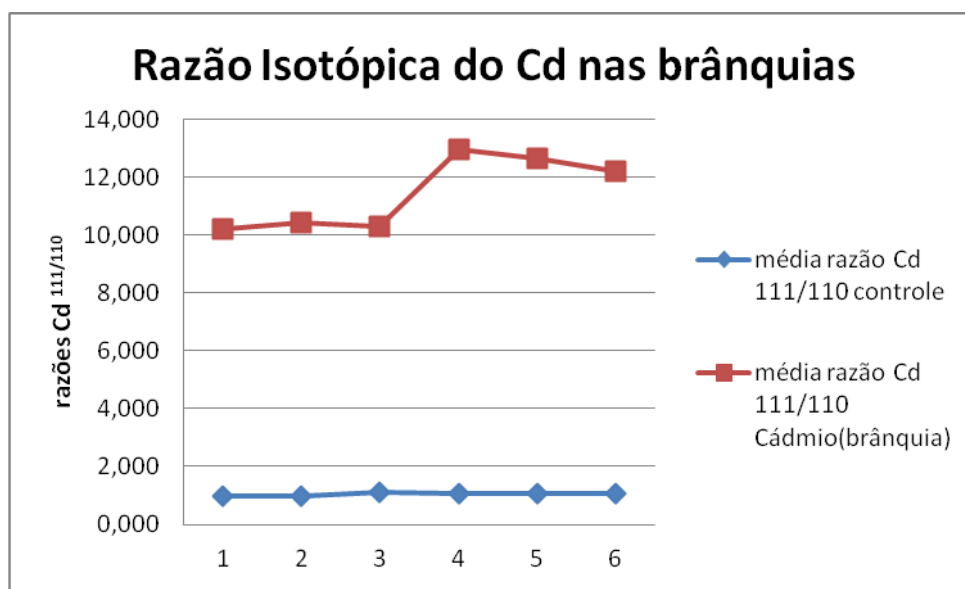


Figura 17- Medidas da razão isotópica de $^{111}\text{Cd}/^{110}\text{Cd}$ obtidas por ICP-MS dos extratos citosólicos de brânquias de *O. niloticus* submetidas a injeção intraperitoneal de volume 100 μL de uma solução contendo 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{111}Cd (95%) em 0,6% de NaCl

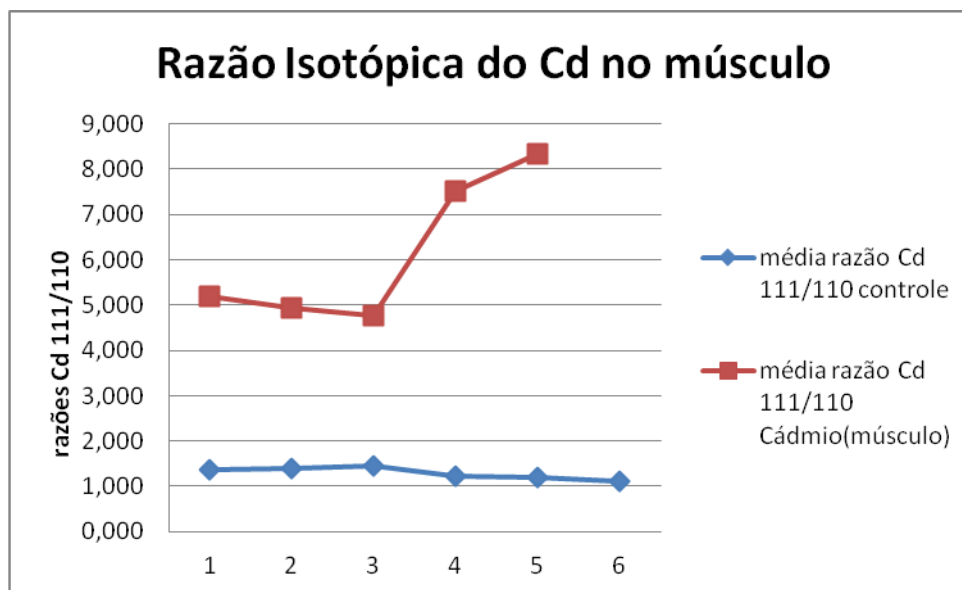


Figura 18- Medidas da razão isotópica de $^{111}\text{Cd}/^{110}\text{Cd}$ obtidas por ICP-MS dos extratos citosólicos de músculo de *O. niloticus* submetidas a injeção intraperitoneal de volume 100 μL de uma solução contendo 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{111}Cd (95%) em 0,6% de NaCl

O mesmo padrão em relação ao aumento das razões nos tratamentos foi observado para as amostras que receberam volumes de 100 μL de uma solução contendo 7,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{65}Cu (99%) em 0,6% de NaCl.. Entretanto os níveis de cobre no músculo não foi significativamente superiores aos da brânquia como observado para o Cádmio Este fato pode ser explicado pela possível interferência do Na que combinado ao argônio (gás utilizado para alimentar a chama do plasma do ICP-MS) forma o mesmo número atômico do ^{65}Cu (Figuras 19 e 20).

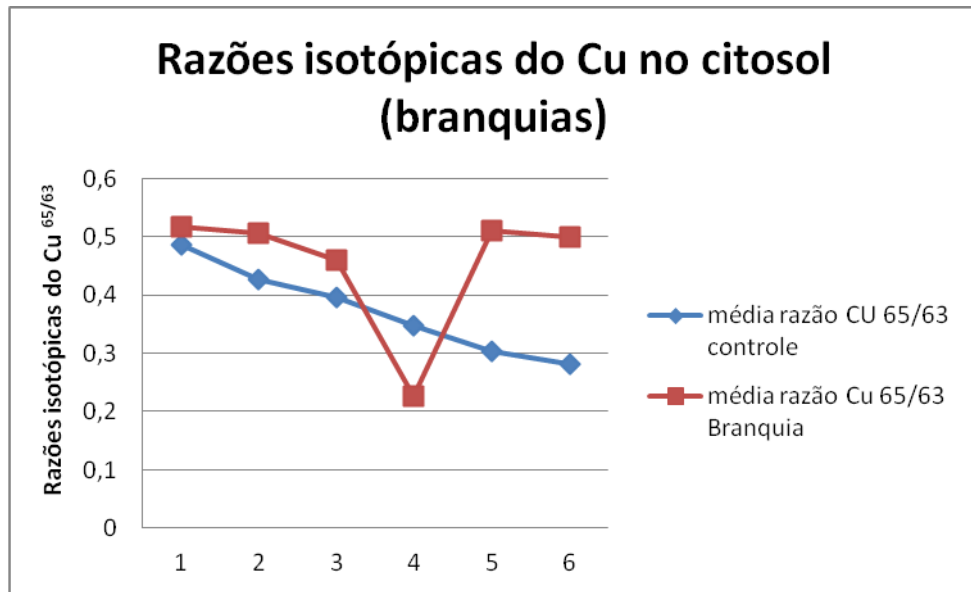


Figura 19 - Medidas da razão isotópica de $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ obtidas por ICP-MS dos extratos citosolicos de brânquias de *O.nilóticus* submetidas à injeção intraperitoneal de volume 100 μL de uma solução contendo 7,5 mg. L^{-1} de ^{65}Cu (99%) em 0,6% de NaCl

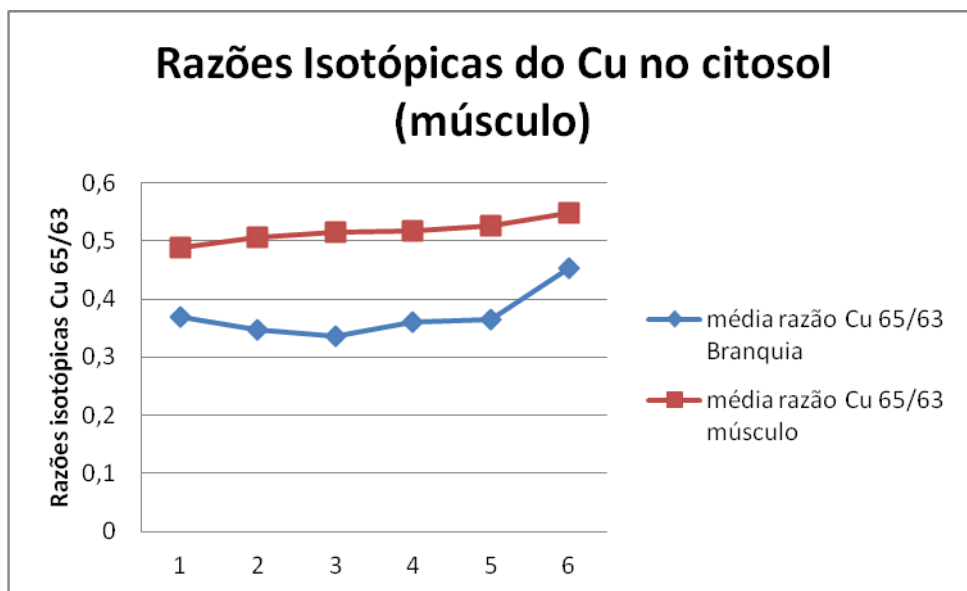


Figura 20 - Medidas da razão isotópica de $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ obtidas por ICP-MS dos extratos citosolicos de brânquias de *O.nilóticus* submetidas à injeção intraperitoneal de volume 100 μL de uma solução contendo 7,5 mg. L^{-1} de ^{65}Cu (99%) em 0,6% de NaCl

Em continuação os resultados observados na água apresentaram razão isotópica alterada. A água foi coletada diariamente em alíquotas de 1L para concentração e subsequente análise no ICP-MS. No processo de concentração da água, cada garrafa contendo 1L de água foi submetida a uma filtragem simples, antes de receber a solução. Após este procedimento as amostras foram submetidas a um sistema de filtragem de pressão, utilizando-se filtro de fibra de vidro GF/F – 0,45 μ m de porosidade, com 47 cm de diâmetro.

Foram separadas três alíquotas de 250 mL de cada amostra e estas receberam o tratamento com os reagentes (triton e PAR). Em seguida foram submetidas, uma de cada vez, ao mesmo sistema de filtração, porém para cada amostra utilizou-se um filtro. O filtro, para esta filtração de água tratada com o PAR e triton 5% (v/v) foi o filtro de membrana GS em ester de celulose 0,22 μ m de poro de 47mm de diâmetro. Os filtros coletados podem ser observados na Figura 16.

Em seguida foi realizada a eluição dos metais contidos nos filtros utilizados, através da mistura 2mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 1mL de água de alta pureza (Figura 21).



Figura 21 - Filtro de membrana GS em ester de celulose 0,22 μ m de poro de 47mm de diâmetro coletado a partir de filtração de amostra de água tratada com o PAR e triton 5% (v/v)

Podemos observar nos resultados de rastreabilidade do Cd na água nos subsequentes dias das coletas uma alteração nas razões isotópicas $^{111}\text{Cd}/^{110}\text{Cd}$ (Figura 22).

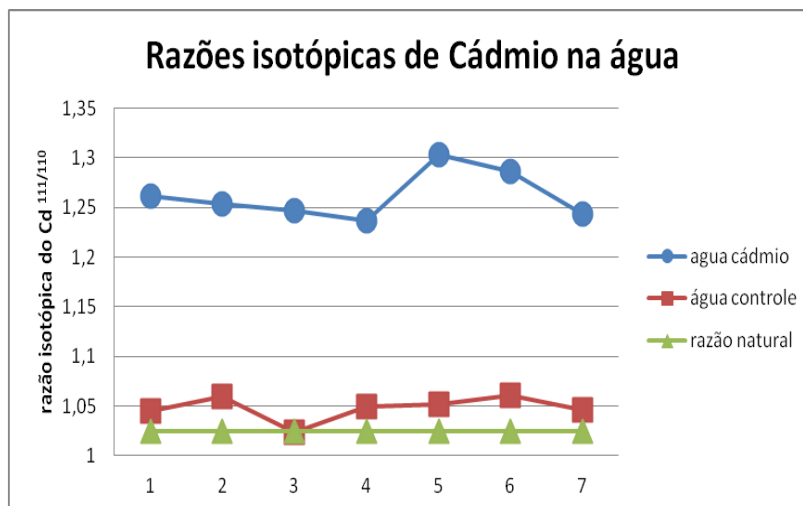


Figura 22 - Razões isotópicas do Cd $^{111}/^{110}$ obtidas por ICP-MS de amostras diárias de água dos aquários que continham os peixes que receberam o tratamento de IP NaCl 0,6% (controle), IP 100 μL de solução contendo 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd em 0,6% Na Cl, pré-concentradas, PAR e triton 5%(v/v)

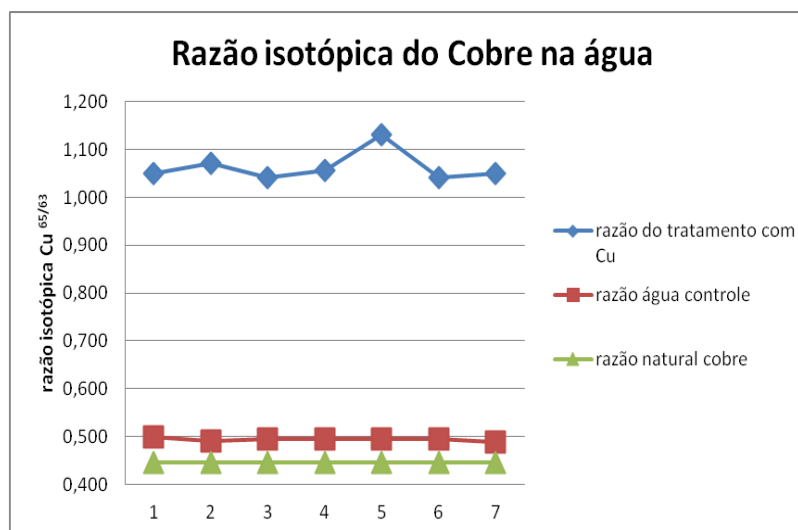


Figura 23 - Razões isotópicas do Cu $^{65}/^{63}$ obtidas por ICP-MS de amostras diárias de água dos aquários que continham os peixes que receberam o tratamento de IP contendo NaCl 0,6% (controle), IP nas doses de 100 μL de solução contendo 7,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu em 0,6% Na Cl, pré-concentradas com PAR e triton 5% (v/v)

Em continuação observou-se que houve uma alteração das razões isotópicas para cádmio e cobre para o compartimento fezes (Figuras 24 e 25). Esta razão foi verificada todos os dias, a partir do início do experimento. Os resultados demonstraram que ocorre a excreção dos metais ao longo dos dias após a IP para os metais cobre e cádmio. Não foi possível verificar uma alteração crescente, que indicasse acúmulo para nenhum dos metais estudados.

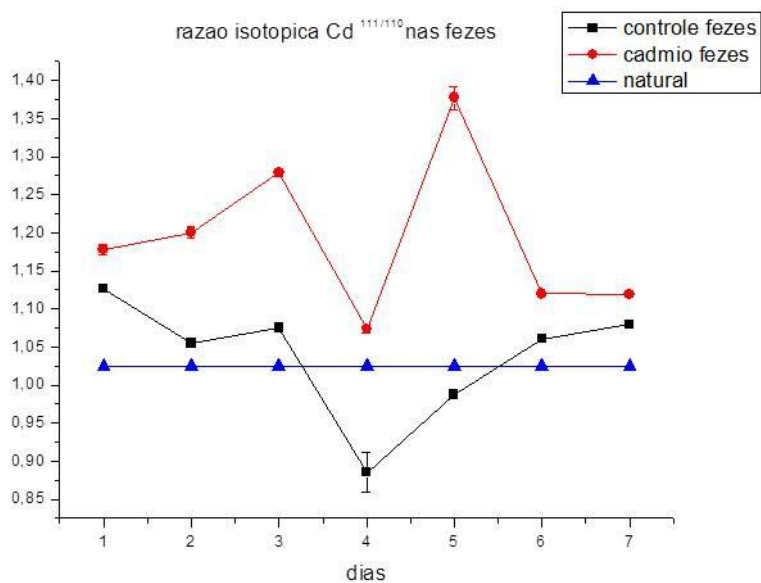


Figura 24 - Razões isotópicas do Cd ^{111/110} obtidas por ICP-MS de amostras diárias de fezes dos aquários que continham os peixes que receberam o tratamento de IP NaCl 0,6% (controle), IP 100 µL de solução contendo 15 mg.L⁻¹ de Cd em 0,6% Na Cl e razão natural de Cd

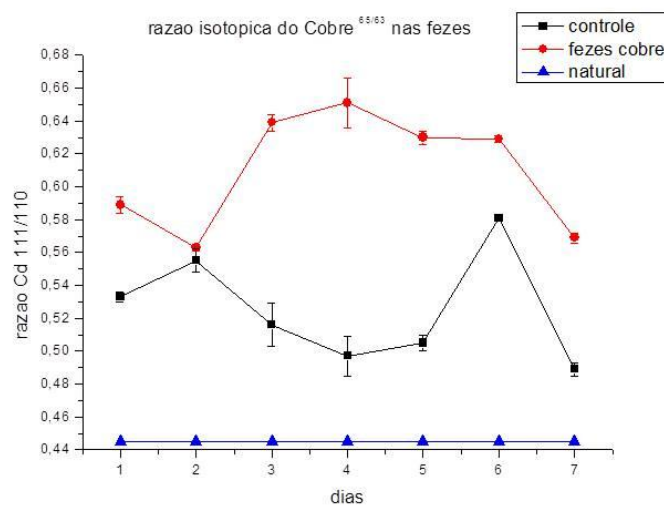


Figura 25 - Razões isotópicas do Cu ^{65/63} obtidas por ICP-MS de amostras diárias de fezes dos aquários que continham os peixes que receberam o tratamento de IP NaCl 0,6% (controle), IP 100 µL de solução contendo 7,5 mg.L⁻¹ de Cu em 0,6% Na Cl e razão natural de Cu

5.5. Espectrômetro de massas (ESI-MS/MS)

Para os extratos do citosol de brânquias, fígado e músculos de tilápias obtivemos os resultados demonstrados nos anexos 1, 2 e 3 respectivamente. Pudemos observar que não foi identificada a metalotioneína e nenhuma proteína semelhante, mesmo se considerarmos outras espécies animais além das tilápias.

6. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

Todo o processamento dos resíduos gerados nesta pesquisa foi tratado de acordo com a resolução CONAMA n^o: 357.

6.1. Resíduos líquidos

Os tratamentos foram estabelecidos em concentrações de 0,1 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 10,0 mg L⁻¹ e 100,0 mg L⁻¹ para Cd, Cu e para Cd+Cu, para o ensaio preliminar e o ensaio agudo. Desta forma foram produzidos cerca de 120 L de efluentes para cada metal. Para a concentração de 0,1 mg L⁻¹ não houve necessidade de tratamento de resíduos para nenhum dos metais estudados, segundo as normas do CONAMA. Na concentração 1,0 mg L⁻¹, apenas Cd e a associação Cd+Cu foram tratados em seus resíduos gerados. Nas demais concentrações todos os volumes de água produzidos nos bioensaios sofreram tratamento para descontaminação.

Os efluentes gerados foram armazenados em tambores plásticos resistentes com capacidade de 50 L, devidamente identificados e conteúdo previamente analisado. Para o processamento foram empregadas soluções concentradas de hidróxidos e de sulfetos, necessários para a precipitação de cada elemento químico. O material utilizado na precipitação foi definido de acordo com o critério do Laboratório de resíduos do CENA, atendendo às prerrogativas do programa de gerenciamento de resíduos desta instituição, seguindo a metodologia descrita por Tavares e Bendassolli (2005).

6.2. Resíduos sólidos

Como descrito na metodologia, os peixes mortos foram retirados e coletados os órgãos de interesse este trabalho. Os demais resíduos de carcaça dos peixes foram liofilizados e tratados como resíduo sólido atendendo as normas do programa de gerenciamento de resíduos do CENA. Ao final dos bioensaios foram produzidos cerca de 10 Kg de carcaça de peixes que foram submetidos à liofilização previamente ao descarte apropriado.

Para o tratamento da digestão ácida foram necessários para análise, nesta pesquisa, cerca de 50 ml de volume digerido de cada órgão. Desta forma, no montante final, foram produzidos cerca de 500 ml de volume para Cd, Cu e Cd+Cu. Esta digestão foi desenvolvida em sistema fechado com o auxílio do microndas sem formação de gases. A solução ácida produzida foi neutralizada no próprio laboratório, previamente ao descarte.

7. CONCLUSÕES

Os ensaios de toxicidade com os sais dissolvidos são essenciais para a determinação da CL_{50} para os organismos.

O uso da injeção intraperitoneal mostra-se vantajoso em relação aos ensaios de toxicidade com as espécies químicas dissolvidas. Estas simplificam o experimental não gerando contaminação das cubas e eliminam a produção de elevada quantidade de efluentes, os quais, dependendo das concentrações devem ser tratados antes do descarte.

Sob situação de estresse os peixes produzem maior quantidade de MTs, sendo essas, em geral, mais concentradas no fígado, seguido das brânquias e no tecido muscular, tanto para o cobre como para o cádmio

A espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) apresentou fortes indícios de possuir um mecanismo eficiente de desintoxicação para o cádmio e para o cobre.

A eletroforese em gel, SDS-PAGE na concentração de 12,5% m/v apresentou melhor separação de proteínas do que aquela na concentração 16,5%. Por esta técnicas eletroforética foi possível identificar as metalotioneínas.

O aparecimento das isoformas de MTs foi verificado na eletroforese capilar e estas apresentaram o tempo de migração próximos de 10 minutos nas condições experimentais estabelecidas.

O emprego do protocolo de Viarengo e colaboradores (1997) foi adequado para fígados e brânquias de *Oreochromis niloticus* e não se mostrou totalmente apropriado para músculos, visto que foram encontradas proteínas de massa molecular elevada nestes tecidos.

Mesmo empregando-se o preparo de amostras proposto por Viarengo e colaboradores (1997), não foi possível a detecção de MTs, pelo Maldi-Tof/Tof, e ESI-MS.

Devido à espécie *Oreochromis niloticus* apresentar uma grande variabilidade relacionada ao estágio de desenvolvimento dos animais e seu peso, para animais jovens deve-se trabalhar com uma margem de segurança maior em relação ao número de amostras requeridas na pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, M.; MOHAMMED, W. Response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to environmental cadmium toxicity during organic selenium supplementation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 8., 2008, Cairo, Egypt. **Proceedings...** Cairo, Egypt: The Central Laboratory for Aquaculture Research, 2008.

ABDEL-TAWWAB, M.; MOUSA, M. A. A.; AHMAD, M. H.; SAKR, S. F. M. The Use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, p. 236-246, 2007b.

ADAMI, G.; BARBIERI, P.; FABIANI, M.; PISELLI, S.; PREDONZANI, S.; REISENHOFER, E. Levels of cadmium and zinc in hepatopancreas of reared *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy). **Chemosphere**, Oxford, v. 48, p. 671-677, 2002.

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

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 6, p. 952-962, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio em peixes. Rio de Janeiro, 2004.

ALAZEMI, B. M.; LEWIS, J. W.; ANDREWS, E. B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. **Environmental Technology**, London, v. 17, p. 225-238, 1996.

ALBA-TERCEDOR, J.; ZMORA MUNOS, C. Bioassessment of organically polluted Spanish rivers, using biotic index and multivariate methods. **Journal of North American Benthological Society**, Glenview, v. 15, n. 3, p. 332-352, 1996.

ALCESTE, C.; JORRY, D. Análisis de las tendencias actuales en comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Union Europea. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1., 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 349.

ALMEIDA, J. A.; NOVELLI, E. L.; DAL PAI SILVA, M.; JUNIOR, R. A. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, London, v. 114, n. 2, p. 169-175, 2001.

ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L.. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environmental International**, Amsterdam, v. 27, p. 673-679, 2002.

ALVAREZ-LLAMAS, G.; DEL ROSARIO, M. F. DE LA CAMPA; SANZ-MEDEL, A. Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 18, p. 460–466, 2003.

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; UKEL, T.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of fresh water fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 143, p. 218–224, 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in fresh water fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 25, p. 33–38, 2008.

ATLI, G.; CANLI, M. Natural occurrence of metallothionein-like proteins on the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc and iron exposures on their profiles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 70, p. 619-627, 2003.

BANAT, K. M.; HOWARI, F. M.; AL HAMAD, A. A. Heavy metals in urban soils of central Jordan: should we worry about their environmental risks. **Environmental Research**, New York, v. 97, p. 258-273, 2005.

BASHA PS AND A.U. RANI: Cadmium induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 218-221, 2003.

BARJHOUX, I.; BAUDRIMONT, M.; MORIN, B.; LANDI, L.; GONZALEZ, P.; CACHOT, J. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 79, p. 272-282, 2012.

BEBIANNI, M. J.; LOPES, B.; GUERRA, L.; HOARAU, P.; FERREIRA, A. M. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. **Environment International**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 550-558, 2007.

BEGUM, A.; MUSTAFA, I. A.; AMIN, M. D. I. A.; CHOWDHURY, T. R.; QURAIISH, S. B.; BANU, N. Levels of heavy metals in tissues of shingi fish (*Heteropneustes fossilis*) from Buriganga River, Bangladesh. **Environmental Monitoring Assessment**, Dordrecht, 2012. DOI 10.1007/s10661-012-2959-4.

BEHOLT, D. A.; LEONHARD, E. N.; CHRISTENSEN, G. M. et al. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 105, p. 550-560, 1976.

BINEY, C.; AMUZU, A. T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I. L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P. B. O.; OSIBANJO, O. Review of heavy metals in the African aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 28, p. 134-159, 1994.

BOOCK, M. V.; MACHADO NETO, J. G. Estudos toxicológicos do oxiclreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, p. 215-221, 2000.

BOPP, S. K.; ABICHT, H. K.; KNAUER, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 86, p. 197–204, 2008.

BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; GUERBEJ, H.; NARBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Acute effects of cadmium on liver phase i and phase ii enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Spaurus aurata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 34, p. 201-207, 2008.

BU-OLAYAN, A. H.; THOMAS, B. V. Trace metals toxicity and bioaccumulation in mudskipper *Periophthalmus waltoni* Koumans 1941 (Gobiidae: Perciformes) **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Trabzon, Turkey, v. 8, p. 215-218, 2008.

BURKE, J.; HANDY, R. D. Sodium-sensitive and -insensitive copper accumulation by isolated intestinal cells of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, n. 2, p. 391-407, 2005.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 247, p. 295-311, 2000.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology. A**, New York, v. 151, p. 437–442, 2008.

CASADO-MARTINEZ, M. C.; SMITH, B. D.; DELVALLS, T. A.; RAINBOW, P. S. Pathways of trace metal uptake in the lugworm *Arenicola marina*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 92, p. 9–17, 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. 1994–2002. São Paulo, 2002.

CHASSAIGNE, H.; LOBIN´SKI, R. Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 829, p. 127–136, 1998.

CHEUNG, P. L. A.; KWOK-LIM LAM, V.; CHAN, K. M. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1731, n. 3, p. 191-201, 2005.

CHOWDHURY, M. J.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 69, p. 149–163, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, 2005. Resolução CONAMA no. 357. Disponível em: <http://www.mma.conama.gov.br/conama>> Acesso em: 01 maio 2012.

COOKER, E. G.; MATTHEUS, P. J. Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 15, p. 209-225, 1983.

COSSON, R. P. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. **Cellular and Molecular Biology**, Noisy-le-Grande, v. 46, p.295-309, 2000.

COSTA, W. M.; GÁLVEZ, A. O.; BRITO, L. O.; SANTOS, E. L. Produção de ortofosfato, amônia, nitrito e nitrato no cultivo de *Litopenaeus vannamei* utilizando dietas com diferentes níveis de proteína vegetal e animal. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 303–310, 2008.

PRÖFROCK, D.; LEONHARD, P.; PRANGE, A. Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 377, p. 132–139, 2003.

DE BOECK, G.; MEEUS, W.; COEN, W. D.; BLUST, R. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 179-188, 2004.

DETENBECK, N. E.; BREZONIK, P. L. Phosphorus sorption by sediments from a soft-water seepage lake. 2. Effects of pH and sediment composition **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 25, p. 403-409, 1991.

DIRILGEN, N. Accumulation of heavy metals in freshwater organisms: Assessment of toxic interactions. **Turkish Journal of Chemistry**, Ankara, Turkey, v. 25, p. 173-179, 2001.

ENGEL, D.W.; BROUWER, M. Metallothionein and metallothionein-like proteins: Physiological importance. **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, Berlin, v. 5, p. 54-75, 1989.

FERNANDES, C.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; FERREIRA, M. A.; SALGADO, M. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz–Paramos Coastal Lagoon Portugal. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 55, p. 262–269, 2008.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZATTO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMANN, G. K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, p. 429-436, 2004.

FLORENCE, T. M.; MORRISON, G. M.; STAUBER, J.; L. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 125, p. 1-13, 1992.

FU, H.; STEINEBACH, O. M.; LOCK, R. A. C.; VAN DEN HAMER, C. J. A.; BALM, P. H. M. Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilápia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium stress. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 16, p. 257-270, 1990.

GAGNON, A.; JUMARIE, C.; HONTELA, A. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 78, p. 59–65, 2006.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; WILSON, J. M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, p. 33-46, 2006.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápias nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 376-381, 2007.

GARDNER, G. R.; YEVICH, P. P. Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 27, p. 2185–2196, 1970.

GEFFARD, A.; AMMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels *Nytilus Edulis*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 61, p. 209-220, 2005.

GEORGE, S. G.; LANGSTON, W. J. Metallothionein as an indicator of water quality-assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: SUTICLIFFE, D. W. **Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems**: Linking levels of organization (individuals, populations, communities). Cumbria, UK: Freshwater Biological Association, 1994. p. 139-149.

GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; GINÉ, M. F.; MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 65-74, 2003.

GHARAHDAGHI, F.; WEINBERG, C. R.; MEAGHER, D. A.; IMAI, B. S.; MISCHÉ, S. M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide

gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. **Electrophoresis**, Wheinwheim, v. 20, p. 601-605, 1999.

GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS)**. Piracicaba: CENA/USP, 1999. 118 p. (Série Didática, 4).

GOERING, P. L.; WAALKES, M. P.; KLAASSEN, C. D. Toxicology of cadmium. In: GOYER, R. A.; CHERIAN, G. M. (Ed.). **Toxicology of metals: biochemical aspects**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. p. 189–214.

GROSELL, M.; HANSEN, H. J. M.; ROSENKILDE, P. Cu uptake, metabolism and elimination in fed and starved European eels (*Anguilla anguilla*) during adaptation to water-borne Cu exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology. C**, New York, v. 120, n. 2, p. 295-305, 1998.

GURGEL, J. J. S.; FERNANDO, C. H. Fisheries in semi-arid Northeast Brazil with special reference on the role of tilapias. **International Review of Hydrobiologie**, New York, v. 79, n. 1, p. 77-94, 1994.

GUTIÉRREZ, J. C.; GONZÁLEZ, A. M.; DÍAZ, S.; ORTEGA, R. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. **European Journal of Protistology**, Amsterdam, v. 39, p. 461-467, 2003.

GUTIÉRREZ, A. J.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; GONZÁLEZ, T.; BURGOS, A.; LOZANO, G.; REGUERA, J. I.; HARDISSON, A. Content of toxic heavy metals (mercury, lead, and cadmium) in canned variegated scallops (*Chlamys varia*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 12, p. 2911-2915, 2007.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MARÍA CAMEÁN, A. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 6, p. 1567-1572, 2011.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Easton, v.11, p.714-719, 1977. Correction, v.12, p.417, 1978.

HANSEN, H.J.M., KELLY, S.P., GROSELL, M., WOOD, C.M. Studies on lipid metabolism in trout (*Oncorhynchus mykiss*) branchial cultures. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 293, n. 7, p. 683-692, 2002.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M. (Ed.). **Curso de piscicultura**. Criação racional de tilapias. Maringá: UEM, 1995. cap. 1.

HOGSTRAND, C.; HAUX, C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology. C**, New York, v. 100, p. 137-141, 1991.

HONDA, R. T.; ARAÚJO, R. M.; HORTA, B. B.; VAL, A. L.; DEMASI, M. One step purification of metallothionein extracted from two different sources. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 820, p. 205-210, 2005.

INÁCIO, A. F. Metalotioneína e metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2006.

ISHIKAWA, N.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V.; FERREIRA, C. M. Hematological parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sub-lethal concentrations of mercury. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 619-626, 2007.

JENSEN, A.; BRO-RASIRIUSSEN, F. Environmental cadmium in Europe. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 125, p. 101-181, 1992.

KAGI, J. H. R.; VALEE, B. L. Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 235, p. 3460-3465, 1960.

KAMARUZZAMAN, B. Y.; ONG, M. C.; RINA, S. Z.; JOSEPH, B. levels of some heavy metals in fishes from Pahang river stuary, Pahang, Malaysia. **Journal of Biological Sciences**, New York, v. 10, p. 157-161, 2010.

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C.; FORLIN, L. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, London, v. 27, p. 81-95, 1985.

KITO, H.; OSE, Y.; SATO, T. Immunohistological cadmium-binding protein (Metallothionein) in Carp. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 66, p. 117-124, 1986.

KITO, H.; OSE, Y.; MIZUHIRA, V.; SATO, T.; ISHIKAWA, T.; TAZAWA, T. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn) – metallothionein in carp hepatopancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 73, p. 121-127, 1982.

KOJADINOVIC, J.; LE CORRE, M.; COSSON, R. P.; BUSTAMANTE, P. Trace elements in three marine birds breeding on Reunion Island (Western Indian Ocean): Part 1. Factors influencing their bioaccumulation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 52, n. 3, p. 418-430, 2007.

LACROIX, A.; HONTELA, A. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 67, p. 13–21, 2004.

LANGSTON, W. J.; CHESMAN, B. S.; BURT, G. R.; POPE, N. D.; MCEVOY, J. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an

indicator of environmental quality? **Marine Environmental Research**, Barking, v. 53, p. 263–293, 2001.

LAURÉN, D. J.; McDONALD, D. G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson - Modulation by water hardness and pH. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, v. 155, n. 5, p. 635-644, 1985.

LAVORANTE, A. F.; GINÉ, M. F.; GERVÁSIO, A. P. G.; MIRANDA, C. E. S.; FIORE, M. F.; BELLATO, C. M.; CARRILHO, E. Identification of a metallothionein in synechococcus by capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 19, n. 12, p. 1611-1616, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LENAT, D. R.; BARBOUT, M. T. Using benthic macroinvertebrate community structure for rapid, cost – effective, water quality monitoring: rapid bioassessment. In: COEB, S. L.; SPACIE, A. (Ed.). **Biological monitoring of aquatic systems**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p. 187-215.

LIEBLER, D. C.; REED, D. J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K. B. (Ed.). **Free radical toxicology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 141-171.

LINDE, A. Independent self-assembly of cadmium-binding α -fragment of metallothionein in *Escherichia coli* without participation of β -fragment. **Protein Engineering**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 1173-1180, 1996.

LINDE, A. R.; INÁCIO, A. F.; VIANA, T. A. P. Utilização de bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. In: CONGRESSO ACADÊMICO SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO DO RIO DE JANEIRO, 1., 2004, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 2004.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 57, p. 195-211, 1993.

LOVSHIN, L. L. Tilapia farming: a growing world wild aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO E PEIXES, 1., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 137.

LOVSHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO E PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1998. p. 1-20.

LU, Y.; ALLEN, H. E. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 277, p. 119–13 , 2001.

MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 54, p. 65-84, 1997.

MASUTTI, M. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; NOGUEIRA, A. M.; SIMÕES, P. C. F. Sensibilidade a cobre a ao cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotis*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2006.

MAYON, N.; BERTRAND, A.; LEROY, D.; MALBROUCK, C.; MANDIKI, S. N. M.; SILVESTRE, F.; GOFFART, A.; THOMÉ, J.-P.; KESTEMONT, P. Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 367, n. 2-3, p. 715-731, 2006.

McBRIDE, M. B. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective? **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 24, p. 5-18, 1995.

MEYLAN, S.; BEHRA, R.; SIGG, L. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, p. 5204–5212, 2003.

MINAMI, T.; YOSHITA, C.; TANAKA, M.; KUBO, K.; OKABE, N.; OKAZAKI, Y. Separation of metallothionein isoforms of mouse liver citosol by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, London, v. 46, n. 2, p. 347-354, 1998.

MINAMI, T.; ICHIDA, S., KUBO, K. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 781, n. 1-2, p. 303-311, 2002.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829) **Ecotoxicology**, London, v. 19, p. 105–123, 2010.

MONTEIRO, S. M.; ROCHA, E.; MANCERA, J. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUZA, M. A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 72, p. 213–223, 2009.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6. ed. Malden: Wiley, 2001. 660 p.

MURAMOTO, S. Vertebral malformation in fish induced by decalcification from the bones with cadmium. **Internationalen Vereinigung ftir theoretische und angewandte Limnologie**, Berlin, v. 21, p. 1309-1313, 1981.

NOEL-LAMBOT, F.; BOUQUEGNEAU, J. M.; FRANKENNE, F.; DISTECHE, A. Role of metallothioneines in storage of heavy metals in marine organisms. **Revue Internationale d'Océanographie Médicale**, Nice, v. 49, p. 13-20, 1978.

NOGAMI, E. M.; KIMURA, C. C. M.; RODRIGUES, C.; MALAGUTTI, A. R.; LENZI, E.; NOZAKI, J. Effects of dietary cadmium and its bioconcentration in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 291-295, 2000.

NORBERG, M. Studies on metallothionein and cadmium. **Environmental Research**, New York, v. 15, p. 381-404, 1978.

NUNES, O. Alerta contaminação é ameaça para vida aquática no “paraná” além dos peixes, pesquisas indicam que há sedimentos e plantas contaminados pelo cobre. **Jornal Umuarama Ilustrado**, Umuarama, 22 dez. 2006.

OAKES, K. D.; KRAAK, G. J. V. D. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 63, p. 447–463, 2003.

OLAFSON, R. W.; THOMPSON J. A. J. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. **Marine Biology**, Berlin, v. 28, p. 83-86, 1974.

OLIVEIRA, M.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 70, p. 20–26, 2008.

OVERNELL, J.; COOMBS, T. L. Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Biochemical Journal**, London, v. 183, n. 2, p. 277-283, 1979.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; AHMAD, F.; RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 174, p. 183–192, 2008.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; BONGA, S. E. W. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 32, p. 303-320, 1995.

PERTTÄ, M.; TERVO, V.; PARMANNE, R. Heavy Metals in Baltic Herring and cod. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 13, n. 11, p. 391-393, 1982.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 2000. 477 p.

PISCATOR, M. On cadmium in normal human kidney together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits. **Nordisk Hygienisk Tidskrift**, Oslo, v. 45, p. 76–82, 1964.

PRATAP, H. B.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and sodium, potassium-ATPase activity in the gills

of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 26, p. 133-150, 1993.

RAO, R. R.; QUADROS, F.; MAZMUDAR, R. M.; MARATHE, M. R.; GANGOLI, S. D. Toxicological effects of aerial application of monocrotophos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, n. 4, p. 473-481, 1980.

ROESIJADI, G. Behavior of Metallothionein-Bound Metals in a Natural Population of an Estuarine Mollusc. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 38, p. 147–168, 1994.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 22, p. 81-114, 1992.

ROMERO-ISART N.; VASÁK M. Advances in the structures and chemistry of metallothioneins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 88, p. 388-396, 2002.

ROTCHER, J. M.; CLARKE, K. R.; NEWTON, D. J.; BIRD, D. J. Hepatic Metallothionein as a biomarker for metal contamination; age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 52, p. 151-171, 2001.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J. M.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p. 177-183, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: Guide for personal computers. Cary, NC, 2007.

SCHAGGER, H.; VON JAGON, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 166, p. 368–379, 1987.

SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 367–379, 1999.

SCHIMITT, C. J.; WHYTE, J. J.; ANNIS, M. L.; ROBERTS, A. P.; TILLITT, D. E. Biomarkers of metals exposure in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 31-47, 2007.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins in silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, p. 850-858, 1996.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. *Revista Bio*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 6-53, 1993.

STEEL, R. G.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: Mc Graw-Hill, 1996. 633 p.

STILLMAN, M. J. Metallothioneins. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 14, p. 461–511, 1995.

STOREY, KB. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Brazilian Journal of Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1715–1733, 1996.

TAGLIARI, K. C.; VARGAS, V. M. F.; ZIMIANI, K.; CECCHINI, R. Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 17, p. 149–157, 2004.

TAVARES, G. A.; BENDASSOLLI, J. A. Implantação de um programa de gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas nos laboratórios de ensino e pesquisa do CENA/USP. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 732-738, 2005.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, London, v. 121, p. 307-320, 2003.

USEPA. **EPA-822-R-01-001**. Update of ambient water quality criteria for cadmium. Washington, DC, 2001.

VERBOST, P. M.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cadmium inhibition of Ca²⁺ uptake in rainbow trout gills. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 253, R. 216-R221, 1987a

VERBOST, P. M.; SENDEN, M. H. M. N.; VAN OS, C. H. Nanomolar concentrations of Cd²⁺ inhibit Ca²⁺ transport systems in plasma membranes and intracellular Ca²⁺ stores in intestinal epithelium. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 902, p. 247-252, 1987b.

VIARENGO, A. Heavy metal in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Critical Reviews in Aquatic Science**, Boca Raton, v. 1, p. 295-317, 1989.

VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates (Review). **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 104, n. 3, p. 355-372, 1993.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric Method for Methallothionein Evaluations in Marine Organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 44, p. 69-84, 1997.

WARREN, L. A.; HAAK, E. A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. **Earth Science Reviews**, Amsterdam, v. 54, p. 261–320, 2001.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 16, p. 4406–4412, 1969.

WEIL, J. H. **Bioquímica geral**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

WELCOMME, R. L. International transfers of inland fish species. In: COURTENAY JUNIOR, W. R.; STAUFFER JUNIOR, J.R. (Ed.). **Distribution, biology and management of exotic fishes**. Baltimore: John Hopkins University Press, 1988. p. 22-40. (FAO Fisheries Technical Paper, 294).

WICKLUND GLYNN, A.; NORRGREN, L.; MÖSSENER, A. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 30, p. 13–26, 1994.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. M. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. **Environmental Reviews**, Kingston, v. 2, p. 187-214, 1994.

WU, S. M.; LIN, H. C.; YANG, W. L. The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 87, p. 296–302, 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Avaliação de risco e do potencial de periculosidade ambiental de agentes químicos para o ambiente aquático. In: _____. (Org.). **Ecotoxicologia aquática** – Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2008. p. 347-382.

ZIKIC, R. V.; STAJN, S. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) exposed to cadmium. **Physiological Research**, Praha, v. 50, p. 105-111, 2001.

ANEXOS

Anexo A – Resultados obtidos no ESI – MS/MS para extratos de citosol de brânquias de tilápias juvenis.

Acesso da proteína	Descrição da proteína	Pontuação da proteína	Massa média da proteína
P00760	Trypsinogen cationic precursor EC 3 4 21 4 Bet	72.537.800	261.091.245
P00489	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	9.595.014	976.716.378
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	5.640.280	977.427.055
P79334	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	4.516.065	977.498.371
O18751	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	4.516.065	977.638.236
P11217	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.610.775	975.484.530
P09812	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.466.522	977.868.577
Q91473	Hemoglobin beta chain	2.765.828	161.084.689
Q98TS0	Hemoglobin beta chain	2.213.588	160.934.139
P56251	Hemoglobin beta chain	2.213.588	163.508.490
O09232	Hemoglobin beta chain	2.213.588	166.880.389
O13078	Hemoglobin beta chain	2.213.588	167.640.908
P02141	Hemoglobin beta IV chain	2.213.588	160.964.145
Q9XTL9	Glycogen phosphorylase EC 2 4 1 1	1.491.831	973.960.384
P11216	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1	848.196	973.673.663
P53534	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1 F	848.196	969.158.549
P06737	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	352.172	975.479.714
P09811	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	352.172	979.394.728

Anexo B - Resultados obtidos no ESI – MS/MS para extratos de citosol de fígados de tilápias juvenis.

Acesso da proteína	Descrição da proteína	Pontuação da proteína	Massa média da proteína
P00760	Trypsinogen cationic precursor EC 3 4 21 4 Bet	56.641.670	261.091.245
P53481	Actin alpha skeletal muscle 1	18.514.410	422.871.698
P10365	Actin	14.770.260	418.635.483
P10990	Actin 15A	14.306.120	421.691.233
P04270	Actin alpha cardiac	14.206.430	423.612.493
P03996	Actin aortic smooth muscle Alpha actin 2	14.206.430	424.082.561
P49055	Actin alpha skeletal muscle Alpha actin 1	14.206.430	423.132.511
P20399	Actin alpha sarcomeric cardiac Alpha 2	14.206.430	423.752.762
P53479	Actin alpha skeletal muscle Alpha actin 1	14.206.430	423.011.967
P53475	Actin muscle	14.206.430	423.282.071
P27130	Actin muscle 2 4 4A	14.206.430	422.991.203
P53480	Actin alpha cardiac	14.206.430	423.171.961
P53460	Actin muscle 1A	14.206.430	423.300.910
O15998	Actin muscle	14.206.430	423.882.382
P53482	Actin alpha skeletal muscle 2	14.206.430	423.191.687
P08023	Actin aortic smooth muscle Alpha actin	14.206.430	423.942.292
P04751	Actin alpha cardiac muscle Alpha 1	14.206.430	423.581.815

Q98972	Actin muscle type MA1	14.206.430	423.011.967
P02568	Actin alpha skeletal muscle Alpha actin 1	14.206.430	423.933.153
P04752	Actin alpha sarcomeric skeletal Alpha 3	14.206.430	422.690.940
P10995	Actin alpha sarcomeric cardiac Alpha 2	14.206.430	423.312.230
P12718	Actin gamma enteric smooth muscle Alpha actin 3	14.206.430	422.761.803
P14235	Actin	14.126.880	419.808.331
Q9UVZ8	Actin	13.895.600	419.668.062
Q92192	Actin Fragment	13.705.880	315.221.599
P07836	Actin muscle A1	13.705.880	422.752.390
P49871	Actin muscle	13.705.880	421.761.033
Q07903	Actin cytoskeletal IIA	13.619.760	420.859.966
P53478	Actin cytoplasmic type 5	13.619.760	421.781.496
Q26065	Actin adductor muscle	13.619.760	421.040.029
P15475	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	421.902.040
O17320	Actin	13.619.760	420.770.316
P17126	Actin non muscle 6 2	13.619.760	420.249.172
P41340	Actin 3	13.619.760	421.500.286
O18500	Actin 2	13.619.760	422.252.058
P45886	Actin 3 muscle specific	13.619.760	421.581.381
P90689	Actin	13.619.760	419.949.254
P02574	Actin larval muscle Actin 79B	13.619.760	421.860.777
Q25010	Actin cytoplasmic A3A	13.619.760	421.750.818
P18603	Actin clone 403	13.619.760	422.371.436
P41113	Actin 3	13.619.760	420.550.107
P53505	Actin cytoplasmic type 5	13.619.760	421.921.765
P41341	Actin 11	13.619.760	422.451.809
P45887	Actin 5 muscle specific	13.619.760	421.129.896
P04829	Actin cytoplasmic A3	13.619.760	422.601.906
P07837	Actin muscle A2	13.619.760	422.591.659
P14227	Actin 1 4	13.619.760	420.298.870
Q27250	Actin cytoplasmic A4 Actin A3B Actin 1D	13.619.760	422.211.442
P53456	Actin 2	13.619.760	420.579.438
P12716	Actin cytoplasmic	13.619.760	421.910.836
P26198	Actin muscle	13.619.760	423.521.888
Q93132	Actin muscle	13.619.760	424.444.542
Q93130	Actin muscle BbMA1	13.619.760	426.326.309
O65316	Actin	13.619.760	417.065.878
Q25472	Actin muscle type A2	13.619.760	425.484.320
P53467	Actin larval muscle type A1	13.619.760	423.311.594
O17502	Actin muscle	13.619.760	427.006.859
Q9P4D1	Actin	13.619.760	419.197.133
O18499	Actin 1	13.619.760	422.342.138
Q00214	Actin muscle	13.619.760	426.395.236
P53455	Actin	13.619.760	419.387.940
P07827	Actin A12	13.619.760	417.415.678

P50138	Actin	13.619.760	420.869.520
P10987	Actin 5C	13.619.760	422.211.442
P10991	Actin cytoskeletal IIB Actin 15B	13.619.760	420.840.242
P53462	Actin cytoplasmic CYI	13.619.760	420.159.092
P92182	Actin 1	13.619.760	421.881.466
P41112	Actin 1 2	13.619.760	419.378.260
P53465	Actin cytoskeletal 1 LPC1	13.619.760	421.841.784
P53470	Actin 1	13.619.760	420.169.553
P53471	Actin 2	13.619.760	420.259.419
P53501	Actin 57B	13.619.760	422.341.834
P18499	Actin cytoskeletal IIIB	13.619.760	421.740.939
P53474	Actin cytoskeletal IIIA	13.619.760	421.891.208
P53472	Actin cytoskeletal IA	13.619.760	421.911.508
O16808	Actin	13.619.760	421.591.228
P49128	Actin 1	13.619.760	421.329.871
P02578	Actin 1	13.619.760	419.038.679
P02576	Actin plasmodial isoform	13.619.760	418.967.866
P43239	Actin I	13.619.760	421.890.537
Q9Y702	Actin 1 Beta actin	13.619.760	419.027.274
P07830	Actin 15 Actin A8	13.619.760	418.297.199
P07829	Actin 3 SUB1	13.619.760	420.129.031
P10989	Actin	13.619.760	420.499.457
P78711	Actin	13.619.760	418.476.747
O42161	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	421.250.428
Q9UUVW9	Actin gamma	13.619.760	418.357.102
P02577	Actin	13.619.760	418.297.199
P53484	Actin cytoplasmic 1 Beta actin 1	13.619.760	421.090.434
P53689	Actin	13.619.760	419.648.528
Q9UVX4	Actin	13.619.760	419.547.538
Q03342	Actin 3 Fragment	13.619.760	350.500.480
P45521	Actin Fragment	13.619.760	364.096.839
P53458	Actin 5 Fragment	13.619.760	414.683.167
O74258	Actin	13.619.760	419.108.192
Q25379	Actin cytoskeletal 3 LPC3 Fragment	13.619.760	196.644.689
Q25381	Actin muscle LPM Fragment	13.619.760	195.263.038
Q92193	Actin Fragment	13.619.760	298.843.551
Q9Y707	Actin 2	13.619.760	420.056.872
P17128	Actin	13.619.760	418.768.213
P53485	Actin cytoplasmic 2 Beta actin 2	13.619.760	421.090.434
P53486	Actin cytoplasmic 3 Beta actin 3	13.619.760	420.679.540
P91754	Actin Fragment	13.619.760	416.085.245
P12431	Actin muscle	13.619.760	414.543.729
P48465	Actin	13.619.760	420.789.488
P53464	Actin cytoskeletal M	13.619.760	421.040.029
P92179	Actin	13.619.760	422.792.786
P45885	Actin 2 muscle specific	13.619.760	421.450.959

P53473	Actin cytoskeletal IB	13.619.760	421.651.038
P92176	Actin 2	13.619.760	421.250.982
P02572	Actin 42A	13.619.760	422.231.167
P12717	Actin muscle	13.619.760	422.941.613
P53466	Actin cytoskeletal 2 LPC2	13.619.760	422.161.777
P53463	Actin cytoskeletal M	13.619.760	420.899.760
P02575	Actin indirect flight muscle Actin 88F	13.619.760	420.989.995
P17304	Actin muscle	13.619.760	421.080.109
P41339	Actin acrosomal process isoform Actin 5	13.619.760	421.741.143
P10981	Actin 87E	13.619.760	422.011.999
P53506	Actin cytoplasmic type 8	13.619.760	421.901.606
O17503	Actin cytoplasmic	13.619.760	419.977.957
O13419	Actin	13.619.760	418.677.090
Q9URSO	Actin gamma	13.619.760	419.848.594
Q93131	Actin cytoplasmic BfCA1	13.619.760	420.058.617
Q93129	Actin cytoplasmic BbCA1	13.619.760	419.898.623
P20359	Actin gamma	13.619.760	418.767.824
Q00215	Actin cytoplasmic	13.619.760	422.151.575
P48975	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	420.800.017
P02571	Actin cytoplasmic 2 Gamma actin	13.619.760	421.351.246
P18601	Actin clone 211	13.619.760	421.831.608
P29751	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	420.980.634
P02579	Actin	13.619.760	419.178.544
P12714	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	420.950.165
P02570	Actin cytoplasmic 1 Beta actin	13.619.760	420.790.170
P00489	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	4.105.275	976.716.378
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	2.586.350	977.427.055
P79334	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	2.528.221	977.498.371
O18751	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	2.528.221	977.638.236
P11217	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	1.918.561	975.484.530
P09812	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	1.375.179	977.868.577
Q9XTL9	Glycogen phosphorylase EC 2 4 1 1	1.021.317	973.960.384
P11216	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1	509.298	973.673.663
P53534	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1 F	509.298	969.158.549
P06737	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	334.464	975.479.714
P09811	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	334.464	979.394.728

Anexo C - Resultados obtidos no ESI – MS/MS para extratos de citosol de
brânquias de tilápias juvenis.

Acesso da proteína	Descrição da proteína	Pontuação da proteína	Massa média da proteína
Q05025	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	126.202.500	357.548.834
P00356	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	108.815.200	358.009.579
O57672	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	106.893.100	250.805.784
P17329	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 2 EC 1 2	89.104.210	366.125.660
P17330	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 3 EC 1 2	88.783.300	365.735.727
P80534	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase muscle	59.590.910	396.414.857
Q01597	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	54.020.410	356.196.079
Q28554	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	50.899.640	349.599.301
P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase liver E	50.717.560	360.931.695
P00355	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	50.115.100	359.330.332
P04797	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	49.894.470	359.901.077
O57479	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	49.888.490	358.640.139
P16858	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	49.826.740	359.640.265
P10096	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	49.359.750	346.104.579
P00761	Trypsin precursor EC 3 4 21 4	48.673.470	250.938.291
P07486	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase I EC 1 2	42.024.310	354.875.388
P07487	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase II EC 1	42.024.310	355.406.055
P10097	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosoli	41.238.920	356.746.473
P24751	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	315.358.069
P24165	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	356.264.603
P56649	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	360.092.706
P24746	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	315.748.840
Q00584	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	361.431.488
P24748	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	316.489.201
P06977	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase A EC 1 2	41.201.210	355.724.358
P24164	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	324.769.113
P24749	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	315.438.312
O44104	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase II EC 1	41.201.210	323.188.524
P24163	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	316.189.403
O44105	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase II EC 1	41.201.210	323.469.062
Q01558	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosoli	41.201.210	356.827.480
P24166	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	41.201.210	315.469.444
P24750	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1 2 1	40.647.690	315.648.425
P32809	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 2 EC 1 2	30.820.840	366.226.675
P32810	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 3 EC 1 2	30.820.840	365.675.880
P17331	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 4 EC 1 2	30.582.710	365.976.902
P04970	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1 EC 1 2	30.565.240	365.536.370
P05123	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	9.433.184	432.501.498
P00489	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	7.928.851	976.716.378
Q9XSC6	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	7.546.285	431.991.051
P24722	Creatine kinase testis isozyme EC 2 7 3 2	7.531.767	432.893.409

P06732	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	6.926.157	433.293.129
P00564	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	6.615.056	432.471.240
P07310	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	6.615.056	432.731.619
P00563	Creatine kinase M chain EC 2 7 3 2 M CK	6.615.056	433.402.524
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	5.802.856	977.427.055
O18751	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.708.792	977.638.236
P79334	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.708.792	977.498.371
P11217	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.628.998	975.484.530
P09812	Glycogen phosphorylase muscle form EC 2 4 1 1	3.144.294	977.868.577
P13104	Tropomyosin alpha chain skeletal muscle	2.108.276	327.797.790
O93620	L lactate dehydrogenase A chain EC 1 1 1 27 LDH	1.902.612	363.320.950
P26517	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosoli	1.589.278	366.277.905
Q9XTL9	Glycogen phosphorylase EC 2 4 1 1	1.526.616	973.960.384
P06753	Tropomyosin alpha chain skeletal muscle type Tro	1.459.167	328.758.676
P53534	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1 F	1.020.033	969.158.549
P04264	Keratin type II cytoskeletal 1 Cytokeratin 1 K	998.088	660.576.386
P11216	Glycogen phosphorylase brain form EC 2 4 1 1	967.577	973.673.663
O13278	L lactate dehydrogenase A chain EC 1 1 1 27 LDH	871.313	364.403.024
O13277	L lactate dehydrogenase A chain EC 1 1 1 27 LDH	871.313	364.393.177
O13276	L lactate dehydrogenase A chain EC 1 1 1 27 LDH	871.313	366.663.880
O93401	L lactate dehydrogenase A chain EC 1 1 1 27 LDH	871.313	363.180.682
P09811	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	457.766	979.394.728
P06737	Glycogen phosphorylase liver form EC 2 4 1 1	448.205	975.479.714
