

“Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em biomarcadores do estresse oxidativo, em brânquias, fígado e rim de *Oreochromis niloticus*.”

FABIANO BOTTA TONISSI

Tese apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Associado Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

São Carlos

2009

Livros Grátis

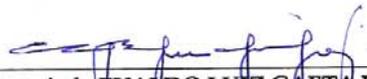
<http://www.livrosgratis.com.br>

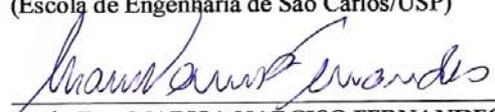
Milhares de livros grátis para download.

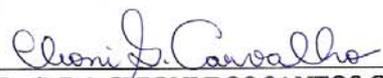
FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel FABIANO BOTTA TONISSI.

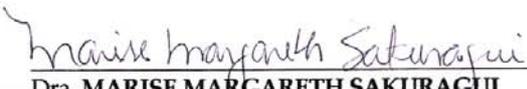
Tese defendida e julgada em 11/09/2009 perante a Comissão Julgadora:

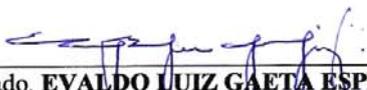

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espindola (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP) aprovado


Profa. Dra. **MARISA NARCISO FERNANDES**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar) aprovado


Profª. Drª. **CLEONI DOS SANTOS CARVALHO**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar) aprovado


Dra. **LIANE BIEHL PRINTES**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar) aprovado


Dra. **MARISE MARGARETH SAKURAGUI**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar/Pós-doutoranda) aprovado


Prof. Associado. **Evaldo Luiz Gaeta Espindola**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental


Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

*Dedico este trabalho a meus pais Silvia
Helena e José Luis (in memoriam), à
minha esposa Rosa e a meus filhos José
Estéfano, Francisco e Maria Clara.*

Agradecimentos

Ao Prof. Associado Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, orientador, exemplo de pesquisador, profissional e ser humano, pelo consentimento ao permitir que eu trabalhasse com o assunto de minha tese, mesmo com minha teimosia em conhecer novas áreas de pesquisa. Obrigado!!

À Profa. Associada Marisa Narciso Fernandes, da UFSCar, co-orientadora, pelo apoio logístico e acadêmico, pela paciência e pelos ensinamentos na realização de todo o trabalho. Minha gratidão pela oportunidade. Obrigado!!

Às tilápias que ofereceram material biológico para as análises.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 140606/2005-0).

À UFSCar e ao Departamento de Fisiologia, pelo uso das instalações do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa.

À Bióloga Dra. Marise Sakuragui, pessoa formidável, pelo apoio e auxílio nas análises e pela amizade. O que aprendi deve-se muito à sua paciência e profissionalismo em me ensinar, sem medir esforços para tanto.

Ao Sr. Ângelo, técnico do LZBC, sempre prestativo para ajudar.

À Dra. Cleoni dos Santos Carvalho, pela padronização dos ensaios enzimáticos e pela ajuda constante.

Ao Prof. Alberto Carvalho Peret pelo auxílio e encaminhamentos com a análise estatística dos dados.

Aos amigos do LZBC/UFSCar, Marcelo, Cleverson, Wallice, Tayrine, Pâmela, Hugo, Natália, Naiara e Helen pelo apoio na retirada dos tecidos das tilápias e/ou pelo apoio acadêmico. Agradeço ao Chico pelo apoio externo, muito importante. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Ao Vitor pela ajuda, imprescindível e árdua com os tecidos de tilápia, sem a qual não seriam possíveis as análises.

Ao Malheiro e Telma, do Parque do Lago, pela amizade e pelo fornecimento de boas tilápias para os experimentos.

Aos amigos do CRHEA, Andréia, Bruna, Domingos, Danilo, Patrícia, Wanderlei, Márcia e Janete, pela amizade e boa companhia.

Agradeço ao Marcelo Nogueira, técnico do CRHEA, pelo auxílio nas análises de metais nas amostras.

Aos meus pais José Luis e Silvia e aos meus irmãos Tatiana, Rafael e Laura, pela caminhada sempre unida, com muito amor.

À Rosinha e aos meus filhos, pelos grandes momentos vividos.

A todos que de alguma forma me ajudaram. Obrigado.

"A ignorância afirma ou nega veementemente,

A Ciência duvida."

(Voltaire)

RESUMO

TONISSI, F. B. **Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em biomarcadores do estresse oxidativo em brânquias, fígado e rim de *Oreochromis niloticus***. 2009. 132p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Uma das formas de se quantificar os possíveis efeitos de metais sobre o estado de saúde de organismo é analisar os biomarcadores do estresse oxidativo. Bioensaios foram realizados com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com concentrações de cádmio (4,25µg/L), cobre (45,0 µg/L) e zinco (260,0 µg/L). Os peixes foram expostos aos metais separados (Cd, CU e Zn), associados dois a dois (Cd/CU, Cd/Zn e Cu/Zn) e aos três metais juntos (Cd/Cu/Zn), por doze dias. Foram retiradas amostras de rim, fígado e brânquias para análise de biomarcadores de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), o efeito da peroxidação de lipídios (HP), a glutathione S-transferase (GST) e a metalotioneína (MT). Pelos resultados obtidos constatou-se que, mesmo nas baixas concentrações de exposição aos metais, ocorreram alterações no sistema de defesa antioxidante de *O. niloticus*. A primeira barreira antioxidante, composta pela SOD, não foi suficiente para barrar os efeitos da exposição aos metais. Em brânquias, onde a ativação desta enzima foi proeminente, formação de HP ocorreu. E, mesmo inicialmente em rim e fígado, tecidos onde ocorreu diminuição da atividade da SOD, ocorreu também a formação de HP nas etapas seguintes. A CAT e a GPx também atuaram no sentido de tentar evitar o aparecimento de HP, mas não foram bem sucedidas neste processo. A GST, como enzima da fase II de biotransformação pode ter auxiliado no processo de eliminação dos metais, mas como ocorre de forma tardia em relação à defesa antioxidante, acarretando danos celulares. Em relação às enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante não se verificou também especificidade de tecidos nas respostas. No entanto, a brânquia foi o órgão que teve maior intensidade nas respostas (em termos de ativação das enzimas), nos tratamentos de metais combinados dois a dois, evidenciando que este órgão, por estar em contato íntimo com a água e ser sede de processos fisiológicos de homeostase, desempenhou papel importante na tentativa de neutralizar os efeitos dos metais.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, metais, estresse oxidativo, glutathione S-transferase, metalotioneína, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

TONISSI, F. B. **Bioassays with metals (Cd, Cu e Zn) and alterations in oxidative stress biomarkers in kidney, liver and gills of *Oreochromis niloticus***. 2009. 132p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

One way of quantifying metals effects upon organisms' health state is to analyse oxidative stress biomarkers. Bioassays were conducted with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with cadmium (4,25µg/L), copper (45,0 µg/L) and zinc (260,0 µg/L). Fishes were exposed to metals separately (Cd, CU e Zn), associated two by two (Cd/CU, Cd/Zn e Cu/Zn) and to three metals together (Cd/Cu/Zn), for twelve days. Gills, liver and kidney samples were taken to analyse oxidative stress biomarkers, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), the effect of lipid peroxidation (HP), an enzyme of phase II biotransformation, glutathione S-transferase (GST) and metallothionein (MT). From results obtained, it was established that, even in low concentrations of metals, *O. niloticus* antioxidant defense system was modified. The first antioxidant barrier, SOD, wasn't able to minimize metal exposition effects. In gills, where activation of this enzyme was prominent, didn't avoid HP formation. And even in liver and kidney, tissues where SOD activity decreased, HP formation also occurred. CAT and GPx also acted trying to avoid HP formation, but weren't successful. GST, like a phase I enzyme, could help eliminating metals, but in a late moment in relation to antioxidant defense, leading to cell damage. For antioxidant enzymes no relation to tissue-specificity response was observed. But gills were the organ which had more intense responses (in terms of enzyme activation), mainly in metals combined two by two, evidencing that gills are important like a first organ in antioxidant defense because it is in direct contact with water and determine the main processes in homeostasis, trying to neutralize metals effects.

Keywords: Ecotoxicology, metals, oxidative stress, glutathione S-transferase, metallothionein, *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Defesas enzimáticas antioxidantes atuam de forma conjunta para proteger as células contra as espécies reativas de oxigênio. SOD=superóxido dismutase, CAT=catalase, GPx=glutathione peroxidase, GR=glutathione reductase, GST=glutathione-S-transferase, G6PDH=glicose-6-fosfato desidrogenase. (modificado de Hermes-Lima, 2004)..... 10
- Figura 2: Exemplar de *Oreochromis niloticus*. 20
- Figura 3: Esquema dos bioensaios realizados com *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações..... 22
- Figura 4: Dados referentes à relação peso e comprimento padrão e peso e comprimento total para *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. 33
- Figura 5: Atividade da superóxido dismutase (SOD) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM. 36
- Figura 6: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM. 36
- Figura 7: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM. 37
- Figura 8: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*. 39

Figura 9: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	40
Figura 10: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	41
Figura 11: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	42
Figura 12: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	44
Figura 13: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	45
Figura 14: Atividade da catalase (CAT) em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.....	48
Figura 15: Atividade da catalase (CAT) no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	48

Figura 16 :Atividade da catalase (CAT) no rim de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.....	49
Figura 17: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	51
Figura 18: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	52
Figura 19: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	53
Figura 20: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	54
Figura 21: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	55
Figura 22: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	56

Figura 23: Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos em média \pm SEM.	59
Figura 24: Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	59
Figura 25: Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no rim de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	60
Figura 26: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPXRim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	61
Figura 27: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPXRim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	62
Figura 28: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPXRim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	63
Figura 29: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPXRim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	64

- Figura 30: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*. 66
- Figura 31: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathiona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*. 67
- Figura 32: Níveis de hidroperoxidos de lipídios (HP) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM. 70
- Figura 33: Níveis de hidroperoxidos de lipídios no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM..... 70
- Figura 34 : Níveis de hidroperoxidos de lipídios no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM..... 71
- Figura 35: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*..... 72
- Figura 36: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*. 73

Figura 37: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	74
Figura 38: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	75
Figura 39: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	77
Figura 40: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	78
Figura 41: Níveis de glutathione S-transferase (GST) em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	81
Figura 42: Níveis de glutathione S-transferase no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.....	81
Figura 43 : Níveis de glutathione S-transferase no rim de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.....	82

- Figura 44: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 83
- Figura 45: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 84
- Figura 46: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 86
- Figura 47: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 87
- Figura 48: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 88
- Figura 49: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutathione S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*. 89
- Figura 50: Níveis de metalotioneína (MT) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM. 92

Figura 51: Níveis de metalotioneína no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	92
Figura 52 : Níveis de metalotioneína no rim de <i>Oreochromis niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.	93
Figura 53: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	95
Figura 54: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquias, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	96
Figura 55: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	97
Figura 56: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	98
Figura 57: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de <i>Oreochromis niloticus</i>	100

Figura 58: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações nominais finais de metais dissolvidos na água dos aquários dos bioensaios.	23
Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos da água dos bioensaios com <i>O. niloticus</i>	32
Tabela 3: Dados biométricos dos peixes utilizados nos bioensaios	33
Tabela 4: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da SOD em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).	34
Tabela 5: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da CAT em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).	46
Tabela 6: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da GPx em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).	57
Tabela 7: Padrão de elevação (preto) ou diminuição (vermelho) dos níveis de HP em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).	68
Tabela 8: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da GST em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. (valores expressos em porcentagem)	79
Tabela 9: Padrão de elevação ou diminuição da concentração de MT em brânquias, fígado e rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. (Valores expressos em porcentagem).....	90

Tabela 10: Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Erro padrão da Média dos peixes utilizados nos experimentos, divididos por grupos de bioensaios.	123
Tabela 11: Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Erro padrão da Média dos peixes utilizados nos experimentos, divididos por grupos de bioensaios.	124
Tabela 12: Atividade da SOD (USOD . mg proteína ⁻¹) em brânquias de <i>O. niloticus</i> . exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	126
Tabela 13: Atividade da SOD (USOD . mg proteína ⁻¹) em fígado de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	127
Tabela 14: Atividade da SOD (USOD . mg proteína ⁻¹) em rim de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	128
Tabela 15: Atividade da CAT (UB . mg proteína ⁻¹) em brânquias de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	129
Tabela 16: Atividade da CAT (UB . mg proteína ⁻¹) em fígado de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	130
Tabela 17: Atividade da CAT (UB . mg proteína ⁻¹) em rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	131
Tabela 18: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína ⁻¹) em brânquias de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	132
Tabela 19: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína ⁻¹) em fígado de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	133
Tabela 20: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína ⁻¹) em rim de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	134

Tabela 21: Níveis de hidroxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em brânquias de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	135
Tabela 22: Níveis de hidroxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em fígado de <i>O. niloticus</i> exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	136
Tabela 23: Níveis de hidroxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	137
Tabela 24: Níveis de glutathione S-transferase (GST) em nmol . min ⁻¹ . mg proteína-1, em brânquias de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	138
Tabela 25: Níveis de glutathione S-transferase (GST) em nmol . min ⁻¹ .mg proteína-1, em fígado de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.....	139
Tabela 26: Níveis de glutathione S-transferase (GST) em nmol . min ⁻¹ .mg proteína-1, em rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	140
Tabela 27: Níveis de metalotioneína (MT) em µg . mg tecido-1, em brânquias de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	141
Tabela 28: Níveis de metalotioneína (MT) em µg . mg tecido-1, em fígado de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	142
Tabela 29: Níveis de metalotioneína (MT) em µg . mg tecido-1, em rim de <i>O. niloticus</i> , exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.	143

LISTA DE SÍMBOLOS e SIGLAS

MFO	mixed function oxidase
CYP450	citocromo P450
GST	glutathione S-transferase
UDPGT	uridina difosfato glucuronil-transferase
$O_2^{\bullet-}$	radical superóxido
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
$\bullet OH$	radical hidroxila
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione (forma reduzida)
LPO	peroxidação de lipídios
HSP	heat shock proteins
MXR	mechanism of xenobiotic resistance
AChE	acetilcolinesterase
CBE	carboxilesterase
EROs	espécies reativas de oxigênio
HP	hidroperóxidos de lipídios
ROOH	radical orgânico
GSSG	ácido graxo
LH	radical lipídico com carbono central
L^{\bullet}	radical lipídico peroxil peroxidante
LO_2^{\bullet}	lipídio hidroperóxido
LOOH	hidróxido de lipídio
PUFA	ácido graxo polinsaturado
MT	metalotioneína
SH	grupamento tiol
L	Litro
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
μg	micro grama
mg	miligrama
M	mol
rpm	rotações por minuto

nm	nanômetro
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
TNB	ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
EDTA	ácido tetraacético etilenodiamínico
mM	milimolar
nmol	nano mol
NBT	nitro blue tetrazolium
U.B.	unidade Bergmeyer
TCA	ácido tricloro acético
BHT	butil hidroxitolueno
TRIS-HCl	trishidroximetilaminometano – ácido clorídrico
β-ME	beta-mercaptoetanol
N	Normal

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Os poluentes e a fisiologia de peixes	2
1.2- Os biomarcadores	5
1.2.1- Os biomarcadores do estresse oxidativo	8
1.2.1.1- SOD – Superóxido dismutase	10
1.2.1.2- CAT – Catalase	11
1.2.1.3- GPx – Glutathione Peroxidase	12
1.2.1.4- GST – Glutathione-S-Transferase	13
1.2.1.5- Hidroperoxidação de Lipídios.....	13
1.3- Os metais e o estresse oxidativo	14
1.4- As metalotioneínas.....	17
2- OBJETIVOS	19
3- METODOLOGIA	20
3.1- Manutenção de <i>Oreochromis niloticus</i>	20
3.2- Bioensaios com metais em laboratório	21
3.2.1- Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo, da peroxidação de lipídios e da metalotioneína	24
3.2.1.1- Obtenção de material de análise.....	24
3.2.1.2- Determinação da concentração de proteína.....	25
3.2.1.3- Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9).....	25
3.2.1.4- Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)	26
3.2.1.5- Catalase (E.C. 1.11.1.6).....	27
3.2.1.6- Glutathione S-transferase (E.C. 2.5.1.18)	27
3.2.1.7- Determinação dos níveis de hidroperóxidos de lipídios – HP.....	28

3.2.1.8- Determinação da concentração de metalotioneína através de grupamentos sulfidrilas (-SH)	29
3.3- Análise estatística dos resultados obtidos	29
4- RESULTADOS	31
4.1- Parâmetros da água de cultivo e de bioensaios.....	31
4.2- Parâmetros biométricos dos exemplares de <i>Oreochromis niloticus</i>	33
4.3- As enzimas do estresse oxidativo, a peroxidação de lipídios, a glutathione S-transferase e a metalotioneína	34
5- DISCUSSÃO.....	102
5.1- Metabolismo oxidativo, níveis de hidroperóxido, glutathione S-transferase e metalotioneína	102
5.2- Biomarcadores como ferramentas para a análise ambiental para exposição de peixes a metais.....	110
6- CONCLUSÕES	112
7- BIBLIOGRAFIA.....	113
APÊNDICE A	122
APÊNDICE B	125

1- INTRODUÇÃO

As ocorrências de contaminação e poluição ambientais recebem cada vez mais atenção de pesquisadores e da sociedade. Muitos tem sido os acidentes que acarretam conseqüências graves ao ser humano, bem como ao sistema ecológico do qual este faz parte. Uma gama variada de substâncias é criada freqüentemente e temos milhões delas já existentes, muitas fazendo parte do sistema de produção de bens materiais e de consumo (HEATH, 1995)

No entanto, o resultado de toda esta dinâmica é que em algum momento, tais substâncias ou seus derivados retornam ao ambiente, na forma em que podem se dissociar e integrar os sistemas ambientais ou na forma integral e sólida, gerando resíduos aparentes. Lixões e aterros surgem na tentativa de receber tais dejetos, o que demanda cada vez mais espaço e tecnologia para o equacionamento deste problema (MALTBY, 1990). Por outro lado os resíduos que se incorporam ao ambiente seguem uma dinâmica ativa e cíclica tendo como destino os compartimentos ambientais bióticos e abióticos. A atmosfera, os corpos d'água e o solo passam a ser depositários destas substâncias, muitas vezes nocivas - ou se não o são, passam a apresentar elevadas concentrações prejudicando o equilíbrio natural – e que em algum momento atingirão os sistemas biológicos.

Em ambos os eventos, inicia-se uma série de mecanismos e reações que tenderão ao equilíbrio dinâmico dos sistemas. Os sistemas biótico e abiótico apresentam atividades químicas e físicas que tenderão a um equilíbrio de energias. No entanto, os sistemas vivos possuem como diferencial a regulação destas reações por moléculas que promoverão a homeostase do sistema, promovendo a manutenção da vida do organismo e de todo um complexo emaranhado de inter-relações de seres vivos (ASAGBA, et.al, 2008).

Neste contexto, grande parte das substâncias existentes no mundo de hoje, naturais e artificiais, tem como destino final os corpos d'água. Sendo assim, os organismos deste habitat sofrem de maneira intensa as conseqüências decorrentes da entrada de poluentes e contaminantes, necessitando lançar mão

dos mecanismos necessários para manter sua homeostase. Os organismos, pelo dispêndio de energia necessária para regular todos estes controles biológicos para sua sobrevivência poderão ter sua saúde afetada e, conseqüentemente poderão causar conseqüências danosas e até irreversíveis ao ecossistema. A entrada de poluentes nestes sistemas acarreta alterações na sua estrutura e dinâmica (RAND, WELLS, McCARTY, 1995).

Entre os diversos poluentes que chegam ao sistema aquático, os metais representam uma fração considerável destes e, ainda desempenham papel crucial na dinâmica dos organismos expostos a estes elementos. Isto porque muitos metais são necessários para uma função fisiológica normal dos seres vivos, quando estão em concentrações traço, como é o caso do cobre, ferro, zinco, manganês, cobalto, selênio e cromo (GILFORD, 1993).

Os metais são uma classe importante de elementos prejudiciais às funções biológicas, quando em excesso. As atividades antrópicas têm elevado as concentrações destes elementos a níveis extremamente prejudiciais, já que a industrialização dos processos de produção tornou-se maciça e na maioria dos casos sem qualquer atenção aos princípios da redução ao mínimo de resíduos gerados.

Os peixes são organismos que, no ambiente aquático, apresentam grande superfície de contato com poluentes. Assim, em ambientes contaminados, a exposição a substâncias nocivas pode levar a diversas alterações, que vão desde mecanismos celulares até a alteração da população ou de toda uma cadeia trófica (HEATH, 1995).

1.1- Os poluentes e a fisiologia de peixes

Recentemente a interação entre a fisiologia e a ecotoxicologia tem se aprimorado, já que muitos parâmetros fisiológicos dos organismos podem ser úteis no estudo dos efeitos das substâncias sobre os organismos (toxicologia aquática) ou para o monitoramento de ambientes poluídos (ecotoxicologia). O estudo dos efeitos de substâncias em concentrações subletais ou letais sobre

organismos aquáticos, como os peixes, torna-se um campo de pesquisa desafiante e promissor na atualidade. As respostas fisiológicas dos peixes são muito interessantes e importantes de serem analisadas sob este contexto (HEATH, 1995).

Quando ocorre uma exposição intensa de um organismo a poluentes, uma cascata de respostas fisiológicas ocorre. Enzimas ou funções celulares, como a permeabilidade de membranas, são alteradas. Estas mudanças afetam a integridade celular, alteram as taxas de secreção hormonal e também as rotas energéticas (HEATH, op. cit.; MALTBY, 1990). Se estas alterações forem severas o suficiente, muitas células podem morrer, o que resultará em alterações histológicas. As alterações nestas células poderão acarretar mudanças em órgãos, os quais poderão ter suas funções comprometidas. Isto pode acarretar uma mudança na permeabilidade de células epiteliais e das brânquias (por exemplo, no caso de organismos aquáticos), comprometendo toda a atividade respiratória do animal. Uma falha na homeostase passa a se configurar nesta situação. Alguns órgãos estabelecerão medidas compensatórias para evitar maiores danos (HEATH, op. cit.; GIULIO;HINTON, 2008).

Indo além, a exposição crônica a agentes poluentes pode levar a uma desestruturação do crescimento do organismo, da sua reprodução (principalmente nos estágios larvais), alteram o sistema nervoso e, conseqüentemente, o comportamento, o que implica na alteração anterior de outros órgãos (HEATH, op. cit.; KLING, 2000; PROSI, 1983; THOMPSON;BANNIGAN, 2008). Por fim, ocorrerão alterações no ecossistema, podendo interferir em outros organismos, até de espécies diferentes, tendo como exemplo a relação presa versus predador. (GIULIO;HINTON, op. cit.)

Para que muitos destes efeitos ocorram é necessário levar em conta a dose da(s) substância(s) em questão e o tempo de exposição ao qual o organismo estará submetido. Assim as doses podem não apresentar um efeito, podem ser sub-letais ou então letais. Nos estudos que envolvem parâmetros fisiológicos, pode-se trabalhar com taxas e/ou concentrações referentes a uma dada informação (taxa de excreção, taxa de batimentos cardíacos, concentração de

glicose, concentração de metalotioneína, entre outros). Assim, o efeito de uma substância pode ser acompanhado conforme estas medidas desviam-se da normalidade, tendo organismos não estressados como referências. E, a duração de uma exposição a uma determinada substância exerce um considerável impacto sobre o caráter qualitativo de uma mudança fisiológica, bem como de seus aspectos quantitativos (GIULIO et. al. 1995; HEATH, 1995).

Quando um poluente interage com um sistema biológico, este pode afetar uma variedade enorme de processos fisiológicos, em diferentes níveis de integração. Assim, as respostas podem ser as mais variadas possíveis. Em verdade, em situações reais (e também em experimentações), diversas são as substâncias que interferem no organismo, podendo potencializar a gama de reações por parte do organismo-alvo, desde o nível celular até o indivíduo. É importante abordar a questão da morte de um indivíduo como "endpoint" em estudos, pois este é um parâmetro muito genérico, que pode ser causado por diversos fatores, não sendo muito específico do ponto de vista da abordagem bioquímica ou fisiológica associada à ecotoxicologia (HEATH, op.cit.; PROSI,1983).

Os peixes ocupam uma posição importante no campo da toxicologia e da ecotoxicologia, sendo utilizados em diversos estudos, tanto para a saúde humana quanto dos ecossistemas. Representam uma classe de vertebrados muito diversa, com cerca de 30000 espécies. Esta diversidade taxonômica se reflete na ampla variabilidade de formas, estilos de vida e fisiologias. Isto se adequa aos diferentes habitat que estes animais ocupam no ambiente aquático – de águas doces à hipersalinas, com temperaturas abaixo do congelamento de águas até temperaturas acima de 45°C, pressões variando de 1 a 1000 atm e outras variações como na radiação solar, pH, concentração de oxigênio, íons e matéria orgânica e tantos outros (GIULIO; HINTON, 2008).

Como o ambiente aquático é um depósito final de resíduos, seus habitantes estão em maior risco de exposição a estas substâncias e, além disso, grande parte de suas superfícies estão expostas à água, como pele e brânquias; são também animais anamnióticos, sendo que os alevinos são extremamente

sensíveis aos agentes químicos. E geralmente as cadeias tróficas neste tipo de ambiente são maiores, favorecendo à bioacumulação de poluentes persistentes.

Em acréscimo à utilização de peixes na ecotoxicologia, os peixes são organismos importantes também para o biomonitoramento. Várias são as abordagens utilizadas nestas situações, onde as espécies-alvo representam um rol de informações que podem ser inferidas desde a mortalidade, passando pela análise de populações e comunidades, chegando até as medidas das mudanças em níveis celulares e sub-celulares (HEATH, 1995; RAND, 1995). Neste último caso, os biomarcadores desempenham uma função de destaque, contribuindo de maneira definitiva para as modernas compreensões do modo de ação de diversas substâncias poluentes, tanto em condições experimentais, quanto em trabalhos de campo, contribuindo significativamente para o avanço da ecotoxicologia. Principalmente no que concerne a sobrevivência em situações de exposição crônica, onde há gasto excessivo de energia para a sobrevivência, já que o organismo está em um estado de desequilíbrio fisiológico (AMIARD;CAQUET;LAGADIC, 2000; PEAKAL, 1999).

1.2- Os biomarcadores

Uma das características essenciais da poluição produzida pelos seres humanos é a sua dispersão. Substâncias como pesticidas, hidrocarbonetos e elementos como os metais são encontrados por toda a biosfera, mesmo em locais remotos, muito distantes de seu ponto de origem ou lançamento. Hoje em dia não há ecossistemas livres da poluição, mesmo os pólos, partes remotas da Terra onde quase não há a presença humana, encontra-se níveis de determinados poluentes que não deveriam ali existir (AMIARD;CAQUET;LAGADIC, op.cit.).

No início do século 20 os critérios quantitativos e qualitativos foram propostos como forma de se estabelecer parâmetros para a qualidade do ambiente. Estes parâmetros eram estabelecidos sob um ponto de vista antropocêntrico, já que o ambiente era visto como um fornecedor de recursos. No

entanto, o conceito de recurso modificou-se ao longo do tempo e de uma abordagem utilitarista, hoje o termo recurso representa não só os alimentos e a matéria-prima, mas envolve recursos genéticos, medicinais, estéticos e recreacionais (AMIARD;CAQUET;LAGADIC, 2000). E, conectado à questão ambiental, surge também o conceito da conservação da biodiversidade (recursos biológicos ou ambientais) e a intensificação da proteção e restauração de áreas importantes do ponto de vista ecológico e paisagístico, como reservas e parques naturais (TUAN, 1980; WEARING & NIEL, 2000).

Com a evolução deste conceito evoluiu também a percepção de que a saúde humana depende da qualidade do ambiente. Agindo sobre os aspectos físicos e biológicos do ambiente, a poluição tem um efeito evidente na saúde humana e na sua evolução, quando afeta, por exemplo, a sua capacidade reprodutiva (ZELIGER, 2008).

É necessário portanto que seja feito um monitoramento da qualidade ambiental a fim de se saber qual é o estado de saúde do ambiente. Há duas maneiras de se fazer isto (AMIARD;CAQUET;LAGADIC, op. cit.):

1- através da detecção e quantificação de poluentes nos meios físicos e biológicos;

2- através da avaliação de parâmetros biológicos de organismos (nível celular ou sub-celular), populações e comunidades ou ecossistemas.

São níveis não excludentes de análise e que se complementam para tentar fornecer informações completas sobre o estado do ambiente. Em outras palavras, a combinação destas diferentes abordagens permite que tenhamos possibilidade de avaliar o estado em que se encontram o ambiente e os organismos que o habitam.

Os métodos baseados nas observações quantitativas e qualitativas foram logo considerados para a análise ambiental. De forma complementar, duas formas de análise foram implementadas na análise ambiental. Uma, voltada para grupos de espécies e o ecossistema, leva em consideração presença ou abundância de espécies, conectadas muitas vezes a descritores matemáticos da estrutura de comunidades. Esta abordagem refere-se aos bioindicadores. A segunda forma de

se trabalhar a questão da qualidade ambiental volta-se para o estudo de parâmetros moleculares, bioquímicos, celulares ou fisiológicos de indivíduos, agrupados em uma terminologia conhecida como biomarcadores (AMIARD;CAQUET;LAGADIC, 2000; GILFORD, 1993; PEAKAL, 1999; RAND, 1995). A ecotoxicologia apresenta uma abordagem integrada destas duas formas de se observar a qualidade ambiental, resultando na associação dos dados das comunidades, ecossistemas, dos níveis celulares ao organismo, com os efeitos de poluentes (RAND, op. cit.;

O nível das pesquisas sobre eventos biológicos e respostas fisiológicas associados à exposição a poluentes aprofundou-se demasiadamente com os avanços tecnológicos, primordialmente no campo da biologia molecular e da bioquímica. Estes eventos e respostas receberam a denominação de biomarcadores, os quais refletem alterações moleculares ou celulares dos organismos. Dentre as várias definições existentes, a que mais se utiliza nos trabalhos e que define de maneira mais exata o escopo das pesquisas e aplicações deste termo, apresenta os biomarcadores como qualquer resposta biológica a uma substância (ou substâncias) ao nível de indivíduo ou abaixo deste nível de organização, resultando em uma alteração no estado fisiológico normal (DECAPRIO, 1997; PEAKAL, op. cit.; WEEKS, 1995).

Os biomarcadores utilizados quando estudam-se peixes (e é válido para muitos outros vertebrados e também para invertebrados) compreendem, segundo VAN der OOST (2005):

- as enzimas da fase I de biotransformação (MFO – mixed function oxidase e CYP450 – citocromo P450);
- enzimas da fase II (GST – glutathione S-transferase e UDPGT – uridina difosfato glucuronil-transferase);
- parâmetros de estresse oxidativo ($O_2^{\bullet-}$ radical superóxido, H_2O_2 – peróxido de hidrogênio, $\bullet OH$ - radical hidroxila; as defesas anti-oxidantes como SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GPx – glutathione peroxidase e GR – glutathione reductase; anti-oxidantes de baixo peso molecular como GSH – glutathione, a própria

GST, β -caroteno ou vitamina B, ascorbato ou vitamina C, α -tocoferol ou vitamina E e ubiquinol; LPO – peroxidação de lipídios e oxidação de DNA);

- produtos de biotransformação (aductos covalentes, vitelogenina, glutatona, porfirinas, hormônios);
- proteínas de estresse (HSP – Heat shock proteins); metalotioneínas; MXR - mecanismo de resistência a multipoluentes (ou xenobióticos);
- parâmetros imunológicos
- parâmetros reprodutivos e endócrinos (P450 aromatase; conversão de andrógenos C19 em estrógenos C18, vitelogenina e a proteína da *zona radiata* em ovos).
- parâmetros neuromusculares (AChE – Acetilcolinesterase e CBE – carboxilesterase);
- parâmetros genotóxicos (aductos de DNA, mutações, produtos de genes mutantes e câncer);
- parâmetros fisiológicos e morfológicos (índices somáticos, fator de condição, crescimento e histopatologia);
- proteômica e genômica.

1.2.1-Os biomarcadores do estresse oxidativo

Em uma situação onde os organismos estão expostos a poluentes, uma cascata de eventos biológicos ocorre. Estas respostas podem servir como biomarcadores frente aos processos que estes organismos desencadeiam por causa da poluição. E, a partir de um determinado ponto, o biomarcador desviará de seu nível normal e poderá manifestar efeitos múltiplos em níveis de organização biológica superiores. O estado de saúde dos organismos é afetado quando ocorrem interferências no metabolismo, causadas pelos poluentes. Este estado de saúde pode refletir-se no equilíbrio entre a eliminação e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), originadas do metabolismo normal em seres

aeróbios, em mecanismos de defesa anti-oxidante e na peroxidação de lipídios (GIULIO et. al. 1995; VALAVANIDIS et. al. 2006).

Durante o metabolismo oxidativo das células de seres vivos aeróbios, são formadas espécies químicas com elétrons livres, com alto poder reativo, os chamados radicais livres. Na utilização do oxigênio, são formados radicais livres como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Os radicais livres têm a propriedade de reagir com biomoléculas, degradando-as, de forma a perderem sua funcionalidade (PRYOR, 1976). Nessa condição, uma das estruturas que podem ser danificadas é a membrana lipídica, formando os hidroperóxidos (HP), pelo processo de peroxidação lipídica (LPO). O processo está demonstrado na Figura 1.

Na diminuição dos efeitos protetores, no aumento da produção dos radicais livres ou na junção de ambos, a célula fica exposta aos efeitos do estresse oxidativo que acarretará em danos às macromoléculas celulares como o DNA, as proteínas e os lipídios, inclusive com danos à membrana celular (BIESALSKI, 2000; KLATT; LAMAS, 2002).

As espécies reativas (pró-oxidantes) precisam ser neutralizadas pelos antioxidantes, já que podem desencadear processos degenerativos na célula. Entre os agentes antioxidantes, as enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) são responsáveis por este processo e, quando há efeitos danosos aos organismos por parte dos poluentes, suas concentrações são alteradas na tentativa de proteger as células. A superóxido dismutase catalisa a produção de H_2O_2 , o qual é removido por outras duas enzimas, a catalase, que reduz peróxido de hidrogênio a água e oxigênio e as peroxidases como a glutathione peroxidase (GPx) que reduz o peróxido de hidrogênio à água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A seguir, os itens descrevem as defesas anti-oxidantes analisadas neste trabalho e o processo de peroxidação de lipídios.

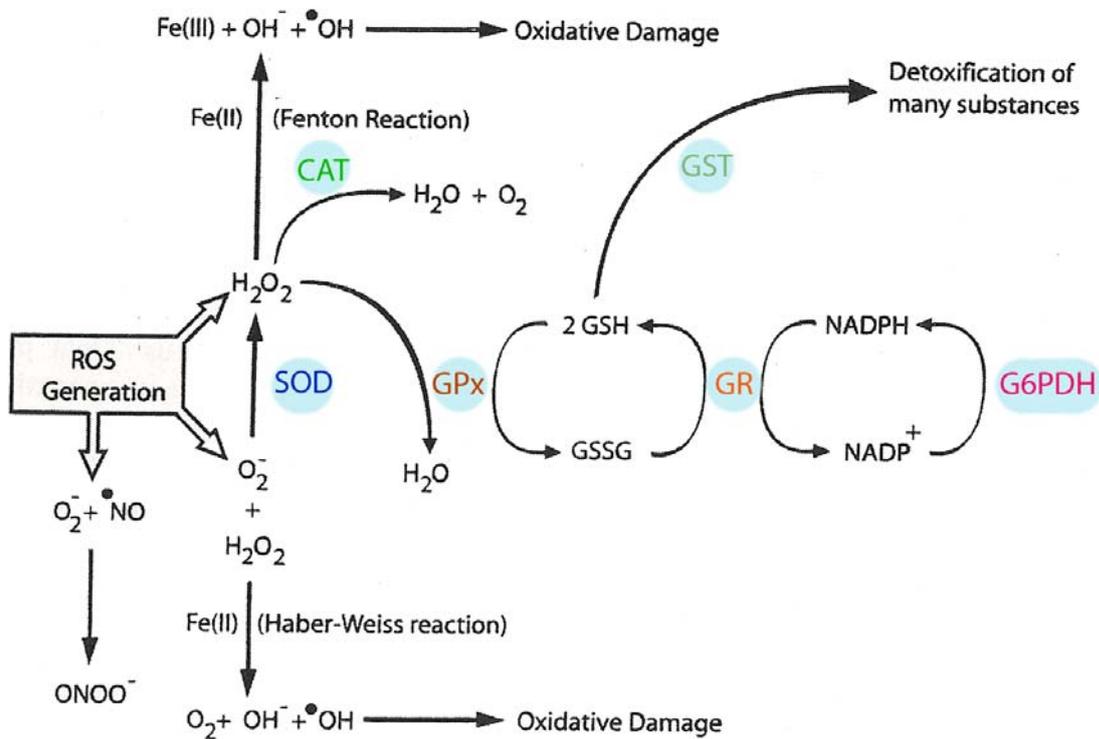
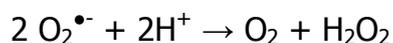


Figura 1: Defesas enzimáticas antioxidantes atuam de forma conjunta para proteger as células contra as espécies reativas de oxigênio. SOD=superóxido dismutase, CAT=catalase, GPx=glutaciona peroxidase, GR=glutaciona redutase, GST=glutaciona-S-transferase, G6PDH=glucose-6-fosfato desidrogenase. (modificado de Hermes-Lima, 2004)

1.2.1.1- SOD – Superóxido dismutase

Existem quatro tipos diferentes de superóxido dismutase. A principal diferença entre elas é o metal presente em sua constituição. Há duas formas de CuZn-SOD, uma forma de Mn-SOD e uma forma de Fe-SOD. Inicialmente descrita a existência da CuZn-SOD apenas no citoplasma, descobriu-se posteriormente que esta enzima ocorre também em lisossomos, peroxissomos, núcleo e no espaço intermembranas da mitocôndria. O íon cobre desta enzima é responsável pela reação de dismutação enquanto que o zinco tem importância na manutenção da estrutura da enzima. O cianeto e o ditiocarbamato removem o cobre desta enzima, sendo inibidores de sua atividade (HERMES-LIMA, 2004).

A superóxido dismutase cataliza a dismutação do ânion do radical superóxido para peróxido de hidrogênio e água, segundo a reação:



A concentração desta enzima tende a ser elevada, já que os radicais superóxidos tem uma reatividade muito grande (LACKNER, 2008). Em alguns tecidos de peixes, podem ser encontradas isoformas da SOD. Há evidências de que estas isoformas são modificações oxidativas das proteínas. Em alguns trabalhos, verificou-se que a atividade da SOD pode ter sua concentração elevada em cerca de 8 a 12 horas a partir da exposição a poluentes, como metais e pesticidas (BAINY et. al, 1996; MATKOVICS et. al., 1987¹ apud LACKNER, op. cit.).

Sob condições de estresse oxidativo, é comum que tanto a CuZn e a Mn-SOD tenham seus níveis de atividade elevados (HERMES-LIMA, op. cit.).

1.2.1.2- CAT – Catalase

A catalase é uma enzima que promove a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a reação:



A enzima catalase encontra-se, nas células animais, principalmente no fígado, rins e eritrócitos. O ferro e a vitamina E são coadjuvantes importantes para atividade da enzima. A estrutura molecular da catalase apresenta quatro subunidades, cada uma com um grupamento porfirina (FeIII-protoporfirina) e uma molécula de NADPH (HERMES-LIMA, 2004). A catalase apresenta um duplo papel, podendo funcionar como um catalisador na dismutação de moléculas de H₂O₂ e

¹ MATKOVICS, B. et. al. (1987) Paraquat as a agent affecting anti-oxidant enzymes of common carp erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C* v.87. p217-219.

realiza a peroxidação quando comporta-se apenas como acceptora de elétrons (AHMAD, 1995).

A elevada atividade da catalase geralmente está relacionada com uma elevada proliferação de peroxissomos e acredita-se que as espécies reativas de oxigênio não induzam, por si só, altas atividades desta enzima. Assim, a proliferação de peroxissomos aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio. Existem catalases presentes tanto no citoplasma como nas mitocôndrias (LACKNER, 2008).

1.2.1.3- GPx – Glutathione Peroxidase

A GPx é uma enzima típica do Reino animal. São conhecidas atualmente quatro formas de GPx, compostas por selênio. A glutathione peroxidase é a peroxidase mais importante para a desintoxicação de hidroperóxidos. A GPx catalisa a redução dependente de glutathione, de hidroperóxidos e do peróxido de hidrogênio, respectivamente:



Sendo composta por selênio, este deve ser obtido através da dieta para seu correto funcionamento. Com a redução de peróxidos, a glutathione peroxidase promove a proteção celular contra danos oxidativos e a acumulação de radicais livres. Este sistema enzimático localiza-se tanto no citoplasma como na mitocôndria. A maioria dos peróxidos do citoplasma são reduzidos pela glutathione peroxidase, embora sua atividade seja um milésimo da atividade da catalase, a qual localiza-se apenas nos peroxissomos (LACKNER, 2008).

1.2.1.4- GST – Glutathione-S-Transferase

A glutathione transferase (ou glutathione-S-transferase) é uma enzima de ampla ocorrência e compreende uma superfamília de enzimas com funcionalidade múltipla. A maioria das isoenzimas estão associadas à desintoxicação de poluentes através da conjugação com GSH (glutathione), promovendo sua excreção (AHMAD, 1995; LACKNER, op. cit.).



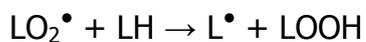
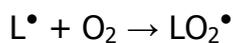
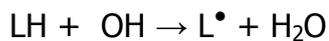
A GST desenvolve diversos tipos de catálises com a participação da GSH, tais como isomerização e trocas disulfeto. Há também processos de conjugação, que é uma reação muito importante para a excreção de xenobióticos lipofílicos, pois estes se apresentarão como glutathione-conjugados e a GST atua também na transformação de prostaglandinas. (AHMAD, op. cit.; YOUNG; BRIEDS, 1989). Esta enzima pode também exercer atividade como peroxidase (CHUNG;WALKER; HOGSTRAND, 2004).

Os conjugados formados nestas reações de desintoxicação são geralmente excretados na bile, através de bombas dependentes de ATP. Podem também ser degradados e acetilados para formar ácidos mercaptúricos (conjugados de N-acetilcisteína), os quais são excretados na urina. A GST pode também apresentar também atividade de GPx selênio-independente (exceto sobre H₂O₂), conforme indica Hermes-Lima (2004).

1.2.1.5- Hidroperoxidação de Lipídios

O processo de peroxidação de lipídios é considerado a maior causa de injúria celular ou morte. Basicamente, a peroxidação de lipídios é uma cadeia de reações, na maioria dos casos catalisadas por metais de transição, onde fortes oxidantes causam a quebra dos fosfolipídios de membrana que contém ácidos graxos polinsaturados (PUFAs – polyunsaturated fatty acids, tais como ácido

araquidônico e o linoléico, dentre outros existentes). Os danos da peroxidação de lipídios pode ter vários níveis de severidade, dependendo da natureza e concentração do oxidante, podendo variar de redução local da fluidez da membrana até o rompimento completo da bicamada lipídica (HERMES-LIMA, 2004).



A iniciação da peroxidação lipídica inicia-se com a subtração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno de uma molécula de PUFA (LH), causada pela espécie oxidante e a formação de um radical lipídico com carbono central (L^\bullet) e um hidroperóxido de lipídio. O radical L^\bullet continua a peroxidação lipídica reagindo com O_2 regenerando o radical lipídio peroxil peroxidante (LO_2^\bullet). A não ser que o lipídio hidroperóxido (LOOH) seja removido (AHMAD, 1995; HERMES-LIMA, op. cit.).

1.3- Os metais e o estresse oxidativo

Os elementos de importância biológica podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com o seu papel funcional (GEORGE, 1994; WITTMANN, 1981):

1) Os maiores elementos formadores dos sistemas biológicos: C (carbono), H (hidrogênio), O (oxigênio), N (nitrogênio), P (fósforo), S (enxofre), que possuem um papel primordial no metabolismo compõem as moléculas biológicas;

2) Os macro elementos, tais como Na (sódio), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio), Si (sílica) e Cl (cloro), os quais tem papel estrutural e estão envolvidos em mecanismos que desencadeiam transporte elétrico, químico ou mecânicos;

3) Os elementos-traço essenciais: Co (cobalto), Cr (cromo), Cu (cobre), I (iodo), Fé (ferro), Mn (manganês), Mo (molibdênio), Ni (níquel), Se (selênio) e Zn (zinco), que geralmente são usados em processos catalíticos ou em reações redox.

4) Os elementos poluentes: As (arsênio), Ag (prata), Au (ouro), Cd (cádmio), Hg (mercúrio), Pb (chumbo), entre outros, que não possuem função bioquímica e, geralmente se apresentam em altas concentrações nos sistemas vivos através de atividades antropogênicas, já que sua abundância na natureza é reduzida.

Diferente dos metais-traços não essenciais, os metais essenciais como cobre, zinco, ferro e cobalto, tem importante papel nas funções bioquímicas do organismo: eles formam um sistema doador de elétron ou exercem função de ligantes em complexos enzimáticos. Uma vez que os elementos traços essenciais são utilizados apenas em pequenas concentrações, seu aumento no organismo não excede níveis que permitem a correta atividade das enzimas. Ou seja, geralmente, as concentrações no organismo são maiores que as concentrações na água. E, se houver maiores concentrações destes elementos-traço na água (principalmente dos não-essenciais), mecanismos homeostáticos de controle regulam o conteúdo de metais dentro do organismo (HEATH, 1995).

Uma vez que as concentrações de metais na fonte (água ou alimento) são altas demais, estes mecanismos cessam e os metais, inclusive os essenciais, passam a exercer efeitos agudos ou crônicos. E assim, em um evento de exposição aos metais, o organismo pode ser prejudicado. Os metais estão geralmente presente nos sistemas impactados. Estes elementos podem alterar o equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e o sistema de proteção antioxidante. Assim, os efeitos tóxicos passam a resultar em alterações no funcionamento das células, podendo levá-las à morte (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

Os ambientes aquáticos são importantes biótopos que deveriam ser sensivelmente controlados, pois a poluição resultante da indústria, agricultura e das atividades humanas são prejudiciais à biota. Os metais podem causar distúrbios à integridade dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de peixes, os

quais não são apenas um componente importante do ecossistema, mas são utilizados também como fonte de alimento (ATLI;CANLI, 2007; BASHA;RANI, 2003). A exposição dos peixes aos metais causa o aumento de espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxila resultando em estresse oxidativo, disfunções osmoregulatórias associadas com a inibição de certas enzimas e danos aos tecidos (AHMAD, 1995).

Experimentos realizados sob condições controladas têm demonstrado amplamente que os biomarcadores podem ser utilizados para avaliar a exposição dos indivíduos aos poluentes, avaliar a sua susceptibilidade ou então avaliar os efeitos dos poluentes nas suas estruturas ou funções vitais. (AMIARD; CAQUET; LAGADIC, 2000).

Almeida et. al. (2002) observou efeitos de cádmio sobre *Oreochromis niloticus*, com alterações na SOD e GPx, mas sem alterações na peroxidação de lipídios, com exposição dos peixes por 60 dias. Efeitos semelhantes foram observados por Basha e Rani (op. cit.) para *Oreochromis mossambicus*. Análises conduzidas por Lopes et. al. (2001) verificaram em campo que metais afetam enzimas antioxidantes como SOD, de maneira sazonal e que a GST apresentou variações correspondentes a mecanismos de defesa contra os efeitos deletérios do cádmio.

Manzli et. al. (2004) reportam que o cobre, em determinadas concentrações, capazes de induzir EROS causam a ruptura do sistema de homeostase do cálcio, provocando danos celulares. Estudos de Vijayavel et. al. (2006) detectaram formação de EROS e ativação de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX e Glutathione) na tentativa de minimizar os efeitos deletérios, e tal objetivo foi conseguido quando foi fornecida alimentação com vitamina C e vitamina E (anti-oxidantes).

Atli e Canli (2007) expuseram *Oreochromis niloticus* a Cd, Cu, Zn e Pb por 14 dias e observaram diversas alterações em diversas enzimas anti-oxidantes, inclusive na catalase do fígado dos organismos, evidenciando o efeito dos metais

sobre o estresse oxidativo. Atli et. al. (2006) analisando o efeito de vários metais (Ag, Cd, Cr, Cu e Zn) observaram que, excetuando a prata, todos os demais metais elevaram as concentrações de CAT no fígado de *Oreochromis niloticus*. Nos rins e nas brânquias, o mesmo estudo revelou que não houve alteração da concentração da catalase nestes tecidos. Nos demais casos, para os outros tecidos analisados houve até mesmo inibição da catalase.

1.4- As metalotioneínas

Além de possuírem sistemas enzimáticos de defesa contra efeitos danosos causados por poluentes, muitos organismos (animais, vegetais, microorganismos eucariontes e alguns procariontes) possuem um sistema de defesa constituído de moléculas não enzimáticas. Podemos citar como exemplo a vitamina C, a vitamina E, a vitamina A, os flavonóides, a melatonina e a metalotioneína (AHMAD, 1995; HALLIWELL, 1999). Em relação a poluição por metais, as metalotioneínas (MT) desempenham um papel importante para proteger as células das ações deletérias dos metais. Nos animais esta proteína é abundante em tecidos parenquimatosos como fígado, rim, pâncreas e intestino e a sua concentração varia nas diferentes espécies e tecidos refletindo efeitos da idade, estágio de desenvolvimento e dieta alimentar (KAGI;SCHAFFER, 1988).

As MT são proteínas de baixo peso molecular (6kDa a 7kDa), ricas em cisteína (30%) e ubíqua em seres vivos (LEY; FAILLA; CHERRY, 1983). Estas proteínas tem capacidade de se ligar a metais. Acredita-se que a sua principal função seja a de regular o metabolismo intracelular de metais, primordialmente zinco e cobre, auxiliando a desintoxicação do organismo, principalmente frente ao Cádmio, Cobre e Chumbo. Sua concentração nos tecidos aumenta após a exposição aos metais (GEORGE; TODD; WRIGHT, 1996; ROCH et.al.,1982). Alguns estudos apontam também para a capacidade de eliminação de antioxidantes pela MT (ATIF et. al., 2006; SCHLENK; DAVIS; GRIFFIN, 1999).

Sabe-se que a MT liga-se aos metais, prevenindo ações tóxicas e danos celulares, podendo inclusive contribuir para um aumento na tolerância dos metais

(LINDE et. al., 2001). No referido estudo, foram encontrados resultados que mostram a MT como um bom indicador de poluição.

Os metais apresentam ainda uma particularidade nos sistemas biológicos, a sua bioacumulação. Após a ingestão do metal e sua entrada nas células, os metais podem se complexar com ligantes como sulfidrilas, hidroxila e imidazol. No entanto, muitos metais possuem alta afinidade a grupos sulfidrilas (SH) , formando compostos mais estáveis. As MT, por conterem grande quantidade de radicais SH tendem a ter os metais ligados de forma mais intensa. Todos estes processos resultam em grande parte, na bioacumulação dos metais, variando de acordo com o tipo de tecido, idade do organismo, estágio de maturidade, sexo e espécie biológica.

Evidencia-se assim que a expressão elevada da MT pode ser utilizada como um reflexo de alterações em níveis celulares fazendo da MT um biomarcador promissor. E, esta proteína correlaciona-se intimamente com o estresse oxidativo e pode ter papel importante auxiliando na ação contra as EROs. Os principais órgãos onde ocorre o aumento de suas concentrações são brânquias, fígado e rim, demonstrando a importância destes tecidos no metabolismo dos metais.

2- OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é analisar os efeitos dos metais Cd, Cu e Zn sobre o estresse oxidativo de *Oreochromis niloticus* em laboratório.

Os objetivos específicos compreendem:

- Avaliar através de bioensaios os efeitos da exposição independente e em conjunto ao Cobre, Cádmio e Zinco, sobre o estresse oxidativo (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase), peroxidação de lipídios, glutathione S-transferase e metalotioneína em rim, fígado e brânquia dos organismos;
- Determinar se os biomarcadores do estresse oxidativo, a glutathione S-transferase e a metalotioneína podem representar um sistema de defesa que auxilie não só a tolerância aos metais, mas também aos demais sistemas antioxidantes;
- Verificar se os biomarcadores analisados podem contribuir para a compreensão e o estabelecimento de níveis de proteção legais para os corpos d'água no Brasil, perante a legislação existente.

3- METODOLOGIA

3.1- Manutenção de *Oreochromis niloticus*



Figura 2: Exemplo de *Oreochromis niloticus*.

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe encontrada em muitas águas tropicais, sendo originária da África (Egito ao Cabo Horn). É um membro da Família dos Ciclídeos. A Tilápia do Nilo (figura 2) caracteriza-se por ser um peixe que contém de 7 a 12 listras na nadadeira caudal e o corpo também apresenta listras verticais. A margem da nadadeira dorsal é cinza ou reta e a região inferior da boca é cinza com tonalidades rosa. Suas nadadeiras dorsais e ventrais apresentam espinhos. Dos gêneros de Tilápia, é o único onde a fêmea mantém os filhotes na boca durante o processo de incubação e nascimento, segurando-os por alguns dias após a eclosão. Atingem comprimento máximo de 60 cm (maior tilápia já medida) e pesa no máximo cerca de 4 Kg. Nos anos 80 foram transpostas da África para combater o crescimento excessivo em países da África, Ásia, Américas e Oceanis. Este é o motivo pelo qual este e outros gêneros de tilápia estão espalhados pelo mundo (POPMA; MASSER, 1999).

A Tilápia do Nilo habita uma quantidade diferente de ambientes aquáticos, de lagos a rios, de canais de irrigação a canais de esgoto. Em ambiente natural é encontrada em águas que variam de 13,5°C a 33°C. Toleram temperaturas que variam de 8°C a 42°C. Consome zooplâncton e fitoplâncton e se adapta bem às rações fornecidas sob condições de cultivo (POPMA; MASSER, op. cit).

Para os bioensaios, foram coletados exemplares de *O. niloticus* em pisciculturas da região, os quais ficaram acondicionados em tanques de 500L e 1000L no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os peixes foram alimentados *ad libitum* diariamente, com ração GUABI – PIRÁ, Ø = 2 a 4mm, com teor mínimo de proteína de 30%. A iluminação foi mantida com fotoperíodo 12h luz :12h escuro. O pH da água manteve-se em torno de 7,0; oxigênio dissolvido 7,01 mg O₂/L, dureza entre 12 mgCaCO₃/L e 16 mgCaCO₃/L e condutividade 70µS/cm.

3.2- Bioensaios com metais em laboratório

Os bioensaios seguiram as normas ABNT (2004). Após um período de quarentena (30 dias, no mínimo), os peixes foram distribuídos em aquários de 200 L (contendo 180L de água), sendo que para cada controle e tratamento foram utilizados 2 aquários, com 12 indivíduos em cada um, perfazendo um total de 24 peixes por controle/tratamento. Os bioensaios foram divididos em duas baterias, conforme a disponibilidade de aquários:

- **Primeira Bateria:** Controle 1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn
- **Segunda Bateria:** Controle 2, Cd/Cu, Cd/Zn, Cu/Zn

Os peixes foram submetidos a exposição aos metais por 12 dias, sendo que a cada 4 dias um lote de 8 organismos foi retirado de cada tratamento (4 em cada aquário, de cada tratamento). Além disso, 8 peixes foram retirados do sistema e considerados como não expostos aos metais no tempo inicial (to), sendo o basal1 para a primeira bateria e o basal 2 para a segunda bateria. Os organismos do

grupo basal1 e basal2 foram utilizados como referência para as comparações de um mesmo tratamento por 4, 8 e 12 dias de exposição. O controle foi utilizado para a comparação dos resultados entre tratamentos em um mesmo período de exposição.

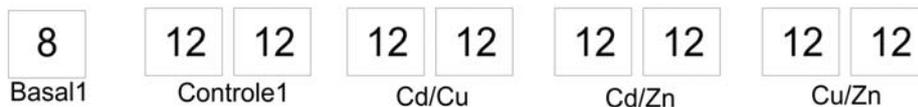
A água dos aquários utilizada foi proveniente do poço artesiano da UFSCar, distribuída pelas torneiras do laboratório. As condições de pH (sensor portátil QUIMIS Q400H), condutividade (sensor portátil CORNING OS-17), oxigênio dissolvido (sensor portátil MINIPA DO) e dureza (titulação com EDTA) foram monitorados constantemente para se avaliar e manter a uniformidade dos testes.

A Figura 3 apresenta um esquema dos bioensaios realizados.

Bateria 1



Bateria 2



Retirada de 4 peixes de cada aquário = 8 por tratamento, a cada 4 dias

Tecidos: brânquias, fígado e rim \Rightarrow SOD, CAT, GPx, GST, HP e MT
Monitoramento da água
Biometria dos peixes

Figura 3: Esquema dos bioensaios realizados com *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Os dados biométricos como comprimento padrão, comprimento total e peso e as condições de saúde dos peixes foram analisados no momento de retirada dos peixes para a montagem dos bioensaios, durante os bioensaios, processamento e obtenção de tecidos. Para isso, utilizou-se régua comum milimetrada e balança.

Para a preparação das soluções de metais foram utilizados o cloreto de cádmio (CdCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em

solução-estoque, a qual fora adicionada aos aquários no respectivo tratamento. As concentrações-testes estão sumarizadas na Tabela 1. As concentrações escolhidas foram aquelas encontradas em campo, em um rio próximo à cidade de São Carlos-SP, o rio Monjolinho, classificado como Classe 2 pela Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) (embora a concentração de cobre atinja níveis de concentração da Classe 3), tendo como referência, valores baseados em estudos anteriores deste sistema (BARRETO, 1999; PELÁEZ-RODRIGUES, 2001; CAMPAGNA, 2005).

Tabela 1: Concentrações nominais finais de metais dissolvidos na água dos aquários dos bioensaios.

Aquário	Concentração dos metais
Controle	-
1 (Cd)	4,25µg/L
2 (Cu)	45,0 µg/L
3 (Zn)	260,0 µg/L
4 (Cd, Cu)	4,25µg/L e 45,0µg/L
5 (Cd, Zn)	4,25µg/L e 260,0µg/L
6 (Cu,Zn)	45,0µg/L e 260,0µg/L
7 (Cd, Cu e Zn) ou 3M	4,25µg/L; 45,0µg/L e 260,0µg/L

Para manter as concentrações sem variações significativas, a quase totalidade da água dos aquários foi trocada, no máximo, a cada 2 dias. A oxigenação foi mantida constante nos aquários e os mesmos foram protegidos lateralmente com plástico preto para evitar estresse visual. O fotoperíodo foi mantido em 12h luz: 12h escuro.

3.2.1-Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo, da peroxidação de lipídios e da metalotioneína

Os organismos coletados foram sacrificados através de incisão e secção na espinha dorsal e tiveram seus órgãos retirados (rim, fígado e brânquias) com auxílio de material cirúrgico. Uma porção de cada órgão foi destinada à análise de proteínas totais, agentes antioxidantes, peroxidação de lipídios e da metalotionina. 200mg de tecido foram suficientes para a análise dos agentes oxidantes, proteína e LPO. Outras 200mg foram destinadas para a análise da metalotioneína. No caso do rim, trabalhou-se com massas de até 100mg. No caso do rim, a quantidade de tecidos obtida foi pequena e procurou-se não utilizar menos que 75mg para qualquer as análises, pois havia o risco de não se obter respostas nas leituras.

A superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e os níveis de peroxidação de lipídios foram analisados em espectrofotômetro TECNAL SP1105. A catalase, a glutathione S-transferase e a metalotioneína foram analisadas em espectrofotômetro BIOCHROM LIBRA S32. As centrifugações foram realizadas em centrífuga VISION VS15000CFN II, refrigerada e em centrífuga HT MDC2000 quando não havia necessidade de refrigeração.

As análises ocorreram com as amostras sempre em gelo e SOD, GPx e HP com o laboratório refrigerado, para que o ensaio ocorresse a temperatura de 25°C. Para a análise da MT, GST, CAT foi utilizado banho-maria para aquecimento da câmara de leitura do espectrofotômetro, sempre em 25°C.

3.2.1.1- Obtenção de material de análise

A homogeneização de tecidos foi realizada com homogeneizador elétrico manual. As amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 e relação 1:3 peso: volume.

Posteriormente, foi realizada a centrifugação do homogeneizado, à 12.000 rpm e 4°C por 20 minutos, em ultracentrífuga. Manteve-se o sobrenadante, para as análises de proteína, CAT, SOD, GPx, GST e HP.

3.2.1.2- Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) com Comassie Brilliant Blue G-250, adaptado para leitura em microplaca conforme descrito por Kruger (1994), utilizando-se como padrão protéico albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas em espectrofotômetro a 595 nm em leituras de microplaca, em Aparelho DYNEX Revelation MRXTC.

A determinação da proteína foi feita no homogeneizado de fígado, brânquias e no rim dos peixes.

Alíquotas de 10µL do homogeneizado original, diluído 20 vezes, foram colocadas nos poços da microplaca. Em seguida adicionou-se 200µL de Reagente de Bradford. A leitura foi realizada a 595nm. O resultado foi expresso tendo como referência uma curva com concentrações conhecidas de proteína. Os resultados foram expressos em mg de proteína por grama de tecido.

3.2.1.3- Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9)

A atividade da GPx Se-dependente foi realizada de acordo com o método descrito por Hafeman; Sunde e Hoekstra (1974) com modificações implementadas pelo Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar.

A GPx degrada H₂O₂ na presença de GSH, depletando-a. A atividade da GPx foi medida indiretamente pela diminuição da quantidade de glutathione reduzida (GSH), avaliada pela reação da GSH com o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A reação da GSH com o DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela, cuja leitura foi feita a 412 nm. A atividade da GPx foi

determinada em uma mistura contendo tampão fosfato de sódio 0,4M (pH7,0) contendo EDTA 0,4mM, azida sódica (NaN₃) 0,01M (para inibir a catalase), 2 mM de GSH e alíquotas do extrato enzimático os quais foram incubados a 37°C em banho-maria. Após 3 minutos de pré-incubação foi adicionado a este meio de incubação peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,25 mM e incubado por 3 minutos. Foi retirada uma alíquota (100 µL) desta mistura de incubação e adicionada uma solução de reagente de precipitação, preparado com 1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl para 100 mL de água destilada q.s.p.. Realizou-se então uma centrifugação a 3000rpm por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato de sódio 0,4 M (pH 7,0) e 1 mM do reagente DTNB em citrato trissódico 1%. Um branco foi simultaneamente carregado com as amostras, uma vez que ocorre oxidação não enzimática da GSH pelo H₂O₂ durante a incubação e a velocidade da reação ocorreu de acordo com a concentração de enzima contida no extrato enzimático.

A atividade enzimática foi medida em espectrofotômetro a 412 nm e expressa em unidades por mg de proteína a 37°C (U=nmol/mL ou nmol/mg de proteína). Uma unidade de GPx foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µg de GSH por minuto (LATHA; PARI, 2004).

3.2.1.4- Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de Crouch *et. al.* (1981), baseado na capacidade desta enzima em inibir a redução do Nitro Blue Tetrazolium (NBT) gerado pelo fluxo de anion superóxido originado pela hidroxilamina (37,5 mM) em solução alcalina. O sal solúvel amarelo oxidado de NBT é reduzido pelo anion superóxido, produzindo o composto formazan azul escuro. A adição de superóxido dismutase inibe a velocidade de redução do NBT, uma vez que a SOD dismuta o O₂. a H₂O₂. O ensaio foi desenvolvido em tampão carbonato de sódio 0,5 M, pH 10,2, EDTA 2 mM com NBT 1,2 mM (protegido da

luz) e extrato enzimático diluído 1:10. A redução do NBT pelo O₂ – dando cor azulada (formazan) - foi medida em espectrofotômetro a 560 nm.

A taxa de redução do NBT do controle, caracterizado pela ausência de amostra e contendo uma mistura hidro-alcóolica (álcool etílico) de 4:1, foi usada como referência. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT. A atividade da SOD foi expressa em unidades (U) por mg de proteína.

3.2.1.5- Catalase (E.C. 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio pelo método de Aebi (1974). A diminuição na absorbância foi registrada durante 17 segundos em cubeta contendo uma solução recém preparada de H₂O₂ 15 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e amostra do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição da solução de H₂O₂ e a leitura realizada em espectrofotômetro a 240 nm a 25°C. Para que as leituras estivessem dentro de valores corretos de absorbância, as amostras foram diluídas em tampão de homogeneização.

Os valores de CAT foram expressos em Unidades de Bergmeyer (U.B.) por mligrama de proteína. Uma U.B., de acordo com Bergmeyer, é a quantidade de CAT que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos a 25°C.

3.2.1.6- Glutathione S-transferase (E.C. 2.5.1.18)

A atividade da GST foi medida de acordo com o método proposto por Habig Pabst; Jacoby (1974). A reação utiliza-se de CDNB 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno como substrato. Os reagentes foram misturados, de forma que o meio de reação continha CDNB 100mM (dilução em etanol), GSH 100mM e extrato enzimático.

Pela reação, formam-se aductos de glutation-2,4-dinitrobenzeno, que foi analisado pelo aumento da absorção em 340nm. Correu-se um branco para comparação. Para o resultado final utilizou-se o coeficiente de extinção molar do CDNB que é de $9,6\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade da GST foi expressa em nmol de produto por minuto por mg de proteína.

3.2.1.7- Determinação dos níveis de hidroperóxidos de lipídios – HP

Os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica (LPO). A hidroperoxidação lipídica foi determinada segundo o método FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol orange) como descrito por Jiang; Hunt e Wolff (1992). O método FOX é baseado na oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{3+} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe(III), o alaranjado de xilenol.

Alíquotas de 100 μL de amostra, previamente tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, foram incubadas durante 30 minutos, a temperatura ambiente, com 900 μL de uma mistura reativa contendo 100 μM de alaranjado de xilenol, 4 mM de butilhidroxitolueno (BHT), 25 mM de ácido sulfúrico concentrado e 250 μM sulfato ferroso amoniacal em metanol 90%. O Fe^{3+} formado na presença de hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido com um pico de absorção em 560 nm. Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ do complexo Fe^{3+} - alaranjado de xilenol para H_2O_2 , hidroperóxido linoleico ou butil hidroperóxido (JIANG et al., 1991). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxido de lipídio por mg de proteína.

3.2.1.8- Determinação da concentração de metalotioneína através de grupamentos sulfidrilas (-SH)

A concentração de grupamentos sulfidrilas (-SH) foi determinada segundo a metodologia descrita por Viarengo et. al. (1997) utilizando-se como padrão a glutathiona reduzida (GSH). Cerca de 200mg de fígado e brânquia (entre 75 e 100mg de rim) foram homogeneizados em tampão TRIS-HCl 20 mM (pH 8,6) contendo sacarose 0,5M, β -Mercaptoetanol (β -ME) 0,01% em homogeneizador elétrico manual a 20.000 rpm. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para as etapas seguintes.

A concentração de metalotioneína foi avaliada utilizando-se uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de passagens em solução de etanol/clorofórmio. As amostras foram secadas em estufa, à 30°C por aproximadamente 2 dias e ressuspendidas em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,25 M e ácido clorídrico (HCl) 1N contendo EDTA 4 mM. A concentração de metalotioneína dos extratos, desnaturada em pH ácido e elevado comprimento iônico, foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de Ellman contendo cloreto de sódio (NaCl) 2M, DTNB 0,43 M em tampão fosfato 0,2M, pH 8,0. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm e os resultados expressos em μ g de metalotioneína por grama de tecido.

3.3- Análise estatística dos resultados obtidos

Para se analisar os padrões de resposta dos organismos frente à exposição ao cádmio, cobre e zinco, aplicou-se uma análise multivariada aos dados obtidos. No sentido de comparar cada grupo de organismo e detectar as enzimas que desempenhavam papel relevante no padrão detectado, foi aplicada a técnica de Análise Discriminante, tanto no sentido de comparar diferentes tratamentos em um mesmo período de exposição, bem como para comparar um mesmo tratamento em diferentes períodos de exposição.

O programa estatístico utilizado foi o XLSTAT version 7.5.2 – 2004 by Addinsoft.

Os dados referentes aos tratamentos Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn estão relacionados ao Controle1 e ao Basal1. Os dados referentes aos tratamentos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn estão relacionados ao Controle2 e ao Basal2.

A análise discriminante proporciona uma maneira de verificar a classificação dos dados obtidos dentro de classes esperadas (peixes classificados dentro do próprio tratamento a que foram submetidos) e comparar estes grupos entre si (comparar tratamentos). A análise discriminante possui dois passos principais: o primeiro é um Teste F (Wilks Lâmbda), para testar se o modelo discriminante como um todo é significativo; o segundo é avaliar se as variáveis independentes diferem significativamente entre si e estas são usadas para classificar as variáveis dependentes, se o teste F for significativo.

Na análise discriminante são geradas funções discriminantes formadas pelas variáveis, as quais são utilizadas para “medir” a diferença entre os grupos analisados (distância de MAhalanobis). Se esta distância for significativa, isto aparecerá no teste F. Além disso, os objetos expostos ao experimento (peixes) são “testados”, através destas equações, para ver se realmente enquadram-se dentro dos grupos onde foram originalmente alocados. Consegue-se também, determinar quais variáveis tiveram maior peso para a diferenciação dos grupos.

O programa XLSTAT espacializa a diferença entre os grupos, através de um gráfico representando geralmente as duas primeiras funções discriminantes (eixos F1 e F2). E também demonstram através de um gráfico circular, com os eixos F1 e F2, o peso das variáveis na determinação das diferenças.

4- RESULTADOS

4.1- Parâmetros da água de cultivo e de bioensaios

Para o pH não foram observadas alterações significativas ao longo dos bioensaios e mantiveram-se em valores similares à água de cultivo, onde os peixes são aclimatados (pH=7,0) e água da torneira usada nos bioensaios (pH=6,8).

Em relação ao oxigênio dissolvido, as concentrações observadas foram favoráveis à execução dos bioensaios, sendo o menor valor 6,79 mg O₂/L e o maior valor 8,25 mg O₂/L. A água de cultivo contém concentrações da ordem de 7,01 mg O₂/L e a água das torneiras, 6,9 mg O₂/L. A dureza ficou estável, com valores de 8 mgCaCO₃/L a 10 mgCaCO₃/L, semelhante à água do bioensaio (água da torneira, proveniente do poço artesiano). A dureza da água de cultivo apresenta valores de 12 mgCaCO₃/L a 16 mgCaCO₃/L. Quanto à condutividade, o sistema de cultivo apresenta 70µS/cm e a água da torneira 48 µS/cm.

Os dados referentes aos parâmetros físicos e químicos da água indicam que não houve alteração que pudesse comprometer o andamento do teste nos 12 dias de exposição. No entanto, em relação à condutividade, que se elevou durante os testes, isto deve-se ao fato do sistema não ter circulação contínua e os dejetos dos peixes tendem a causar esta elevação, mas sem causar prejuízos aos organismos.

A troca da água dos aquários foi um procedimento importante neste experimento, já que evitou alterações bruscas na água, impedindo inclusive elevações maiores na condutividade.

Os resultados obtidos referentes aos parâmetros físicos e químicos da água coletada durante o período de exposição dos peixes aos metais e o controle estão apresentados na Tabela 2.

Em relação à mortalidade, esta ocorreu nos grupos Cd (25%), Cu, Zn, Cd/Cu/Zn (13%), Cd/Zn (4,2%), Cu/Zn (8,4%).

Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos da água dos bioensaios com *O. niloticus*.

Parâmetros	Tempo (dias)	<i>pH</i>		<i>Condutividade</i> ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		<i>Temperatura</i> ($^{\circ}\text{C}$)		<i>Dureza</i> ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)		<i>Oxigênio Dissolvido</i> (mg/L)	
		Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2
<i>Tratamento</i>		Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2	Aq1	Aq2
<i>Inicial</i>	0	7.5	7.5	60	80	23.9	23.9	8	8	7.04	7.12
	4	7.27	7.31	100	130	22.0	22.0	8	8	7.98	7.34
<i>Controle</i>	8	7.15	7.23	90	90	22.5	22.5	8	10	7.98	7.82
	12	7.38	7.45	90	100	22.0	22.0	8	10	7.65	7.82
<i>inicial</i>	0	7,55	7,55	60	60	24.0	24.0	8	8	6,81	6,87
	4	7.73	7.81	110	120	24.8	24.8	8	8	7.02	7.1
<i>Controle 2</i>	8	7.45	7.44	100	120	24.3	24.3	8	8	7.89	7.9
	12	7.56	7.61	90	100	24.1	24.1	8	8	7.97	8.12
<i>Inicial</i>	0	7.5	7.5	80	60	23.9	23.9	8	8	6.88	6.97
	4	7.38	7.35	120	140	22.0	22.0	10	8	7.12	7.43
<i>Cd</i>	8	7.40	7.37	90	110	22.5	22.5	10	10	7.68	7.54
	12	7.76	7.59	90	100	22.0	22.0	10	10	7.81	7.71
<i>Inicial</i>	0	7.50	7.50	70	60	24.0	24.0	8	8	7.01	6.87
	4	7.29	7.35	110	120	22.0	22.0	10	10	7.45	7.23
<i>Cu</i>	8	7.41	7.29	80	90	22.5	22.5	8	8	7.7	7.82
	12	7.39	7.41	100	100	22.0	22.0	10	8	7.84	7.76
<i>Inicial</i>	0	7.50	7.50	70	60	24.0	24.0	8	8	7.12	6.97
	4	7.19	7.09	100	110	22.0	22.0	8	8	7.65	7.23
<i>Zn</i>	8	7.30	7.34	90	100	22.5	22.5	10	10	7.56	7.7
	12	7.38	7.41	100	100	22.0	22.0	8	10	7.58	7.43
<i>Inicial</i>	0	7.55	7.55	70	60	24.0	24.0	8	8	6.94	6.85
	4	7.72	7.75	140	170	24.5	24.5	8	8	7.59	7.21
<i>Cd/Cu</i>	8	7.6	7.59	100	150	24.3	24.3	8	10	7.87	7.92
	12	7.7	7.6	100	100	24.2	24.2	8	8	7.9	8.21
<i>Inicial</i>	0	7.55	7.55	60	60	24.0	24.0	8	8	6.79	6.84
	4	7.78	7.8	140	130	24.4	24.7	8	8	6.86	6.89
<i>Cd/Zn</i>	8	7.35	7.33	110	100	24.3	24.3	8	8	7.34	7.78
	12	7.45	7.38	110	100	24.0	24.0	8	8	8.23	8.19
<i>Inicial</i>	0	7.55	7.55	70	60	24.0	24.0	8	8	6.93	6.91
	4	7.77	7.76	160	150	24.4	24.4	8	8	6.92	7.05
<i>Cu/Zn</i>	8	7.22	7.23	120	110	24.3	24.3	8	8	7.92	7.68
	12	7.43	7.4	110	110	24.0	24.0	8	8	8.04	8.25
<i>Inicial</i>	0	7.5	7.5	60	80	23.9	23.9	8	8	7.04	7.12
	4	7.27	7.33	150	130	22.0	22.0	8	10	7.76	7.24
<i>Cd/Cu/Zn</i>	8	7.27	7.19	100	110	22.5	22.5	8	8	7.64	7.65
	12	7.59	7.49	110	120	22.0	22.0	8	8	7.91	7.79

Aq=Aquário

4.2- Parâmetros biométricos dos exemplares de *Oreochromis niloticus*

Os dados biométricos referentes aos peixes estão sumarizados na Tabela 3 e na Figura 4. Os dados detalhados encontram-se no Anexo A

Tabela 3: Dados biométricos dos peixes utilizados nos bioensaios

	Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)
Média	262.84	23.88	19.94
Desvio Padrão	66.13	2.37	2.17
CV	25.16	9.93	10.89
SEM	4.83	0.17	0.15

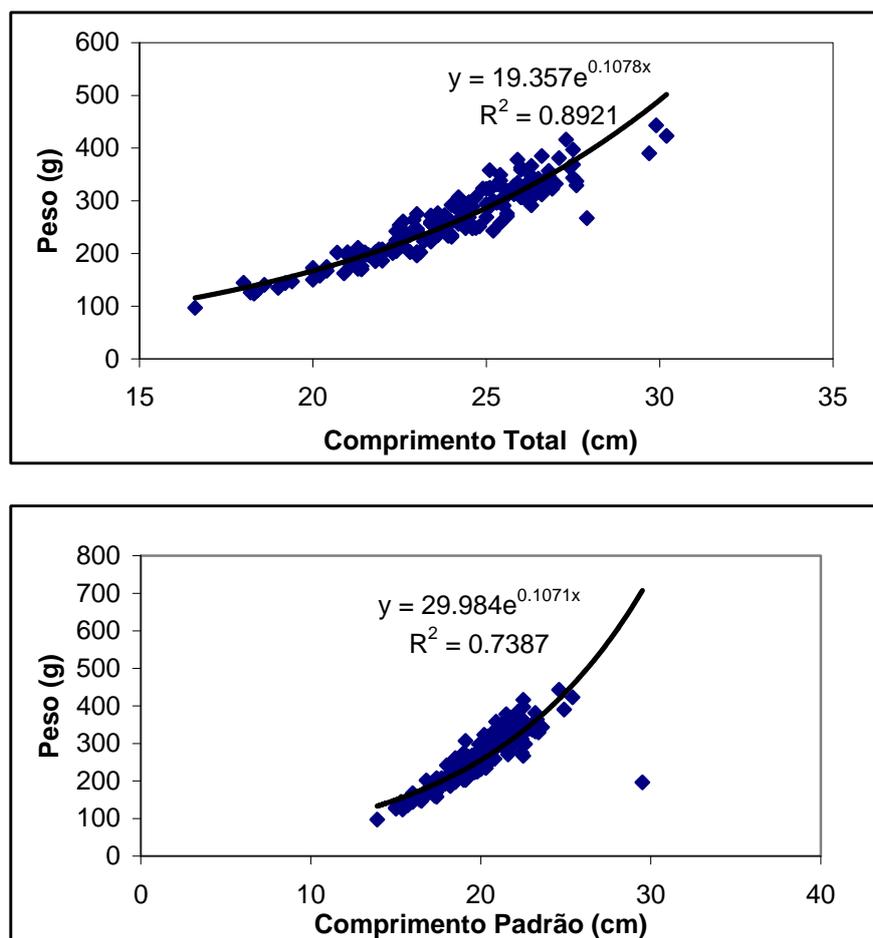


Figura 4: Dados referentes à relação peso e comprimento padrão e peso e comprimento total para *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

4.3- As enzimas do estresse oxidativo, a peroxidação de lipídios, a glutathiona S-transferase e a metalotioneína

Todos os dados referentes ao estresse oxidativo encontram-se no ANEXO B. Uma síntese dos resultados obtidos para o aumento ou diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da SOD em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).

		<i>Tratamento</i>						
SOD Brânquia	Dias	Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	34,94	7,65	52,18	58,73	14,38	8,66	3,66
	8	43,29	1,68	1,16	16,42	27,71	36,29	37,26
	12	14,70	15,50	0,69	3,00	0,99	7,97	38,69
Ref. Basal	4	153,07	73,21	185,41	197,69	3,88	10,83	16,90
	8	499,53	325,46	323,27	387,09	22,69	31,86	32,89
	12	399,60	268,07	338,57	348,61	37,77	42,15	61,47
SOD Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	29,78	4,02	35,75	38,33	17,35	34,06	11,57
	8	41,74	15,22	27,78	31,80	26,61	30,55	41,27
	12	16,27	15,84	53,35	39,53	24,03	22,14	23,99
Ref. Basal	4	28,60	2,41	34,67	37,30	6,26	25,22	0,29
	8	56,08	36,09	45,56	48,59	2,45	43,80	52,47
	12	55,59	55,36	75,26	67,93	40,89	39,41	40,85
SOD Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	38,31	34,27	22,85	34,19	1,09	32,07	43,12
	8	3,74	0,50	18,03	8,84	1,13	23,50	10,11
	12	18,07	17,56	42,12	47,17	21,47	11,45	7,79
Ref. Basal	4	4,32	11,16	30,46	11,29	20,72	17,09	30,57
	8	22,55	19,95	34,05	26,66	39,71	54,39	34,36
	12	23,11	22,63	45,68	50,42	43,68	48,32	57,24

Observando-se os resultados obtidos para as brânquias, em relação ao controle, a atividade da SOD indicou inibição ao longo de todo o experimento para os tratamentos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Ocorreu aumento da atividade da SOD nos tratamentos Cd, Zn e Cd/Cu/Zn. Na exposição ao cobre, ocorreu elevação da atividade apenas em 8 dias. Em relação ao grupo basal, ocorreu aumento na atividade da SOD em 4, 8 e 12 dias para os grupos Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn. Para os grupos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn ocorreu aumento da atividade somente em 4 dias de exposição.

Para o fígado os dados mostram que houve inibição da atividade da SOD nos tratamentos Cd, Cu, Zn, Cd/Cu/Zn, Cd/Zn e Cu/Zn e para o grupo Cd/Cu ocorreu elevação da atividade em 8 dias de exposição apenas. Em relação aos níveis basais, ocorreu inibição da atividade da SOD nos tratamentos Cd, Cu, Zn, Cd/Cu/Zn e Cd/Zn. Em Cd/Cu ocorreu aumento da atividade da SOD em 8 dias e em Cu/Zn ocorreu aumento da atividade em 4 dias.

Para o rim ocorreu inibição da atividade da SOD nos tratamentos Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn, em relação ao grupo controle. Para a exposição ao Cd/Cu houve elevação na atividade da SOD em 4 e 8 dias de exposição para o tratamento Cd/Cu. Ocorreu aumento da atividade nos grupos Cd/Zn em 12 dias de exposição e em 8 dias para o grupo Cu/Zn.

As Figuras 5, 6 e 7 representam os dados obtidos para as análises da SOD nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

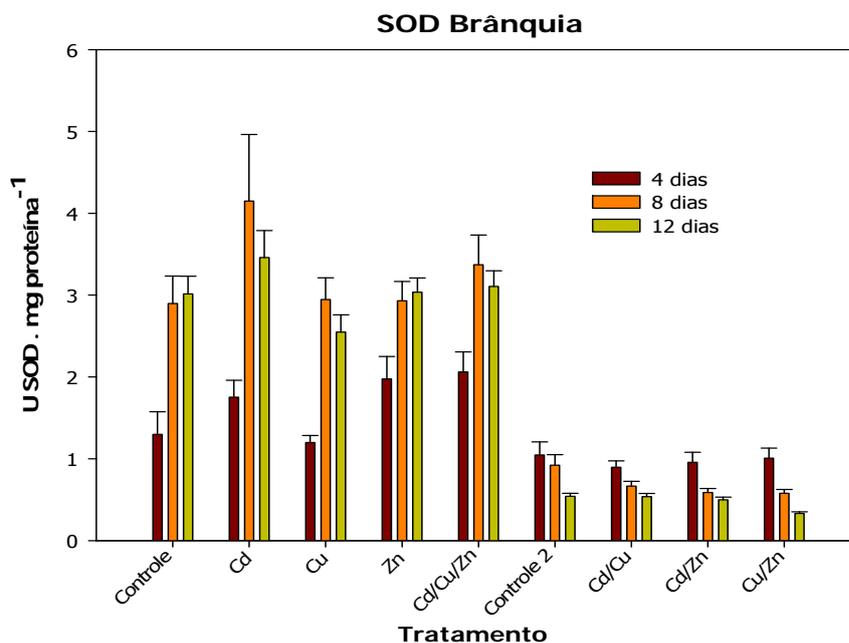


Figura 5: Atividade da superóxido dismutase (SOD) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

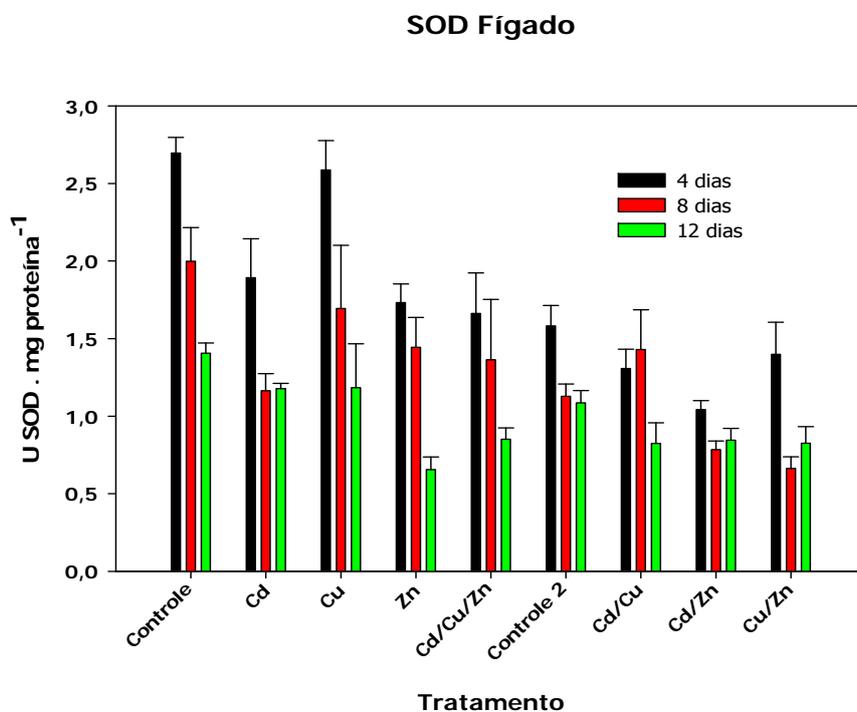


Figura 6: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

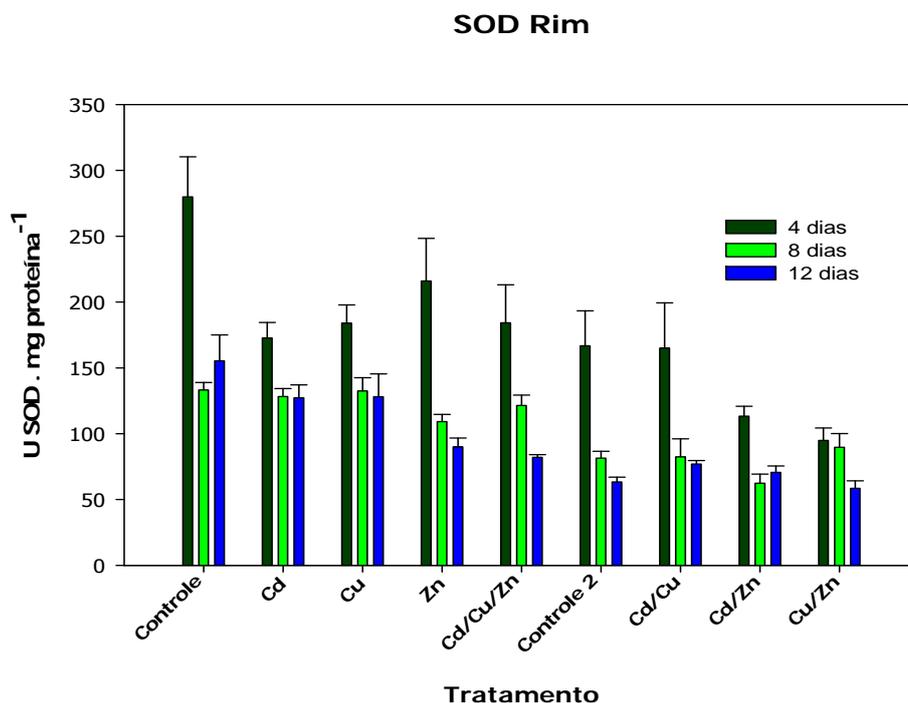


Figura 7: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

Pelos dados das análises discriminantes observou-se que, na comparação dos tratamentos ao longo de 12 dias, apresentados nas Figuras de 8 a 11 para o primeiro bioensaio (Figuras 8 e 9) o grupo Controle1 ao longo de 4, 8 e 12 dias diferenciou-se dos demais, sendo que os resultados da atividade da SOD em fígado e rim foram responsáveis por esta discriminação. Nestes tecidos ocorreu a inibição da atividade da SOD.

Na exposição ao Cd, o grupo exposto por 4 dias diferenciou-se dos demais e não houve significativa diferença entre a exposição por 8 e 12 dias. A atividade da SOD no fígado, primordialmente, e no rim foram importantes para este padrão de respostas. Para a exposição ao cobre, houve distinção do grupo basal para o grupo de exposição por 12 dias. E entre os grupos de peixes expostos ao cobre, houve diferenças significativas entre o grupo exposto por 4 dias em relação aos demais períodos. Não houve diferença entre 8 e 12 dias. A atividade da SOD em fígado e rim contribuiu em grande parte para este padrão de diferenciação.

Quanto ao tratamento de exposição ao zinco, houve uma clara distinção entre o grupo basal e os demais e uma diferenciação significativa entre todos os tratamentos. Assim, as alterações na atividade da SOD foram promovidas de forma a ocorrer redução de sua atividade de 4 a 12 dias, principalmente no fígado e rim. Para a exposição aos três metais combinados, houve uma diferença significativa para o grupo exposto por 12 dias em relação a todos os demais grupos. Em relação aos níveis basais, somente os grupos expostos por 8 e 12 dias se diferenciaram. A principal diferença observada foi a inibição desta enzima no rim e no fígado.

Nos experimentos referentes à exposição à dois metais combinados (Figuras 10 e 11) temos que em relação ao cádmio e cobre (Cd/Cu), observou-se que houve uma diferença dos grupos em experimento por 8 e 12 dias em relação aos níveis basais, sendo que a atividade da SOD nos três tecidos influenciou intensamente esta situação (mas primordialmente brânquia), pois ocorreu intensa inibição da sua atividade nas brânquias, fígado e rim. Isto ocorreu também no tratamento Cd/Zn e a análise discriminante mostra que houve diferença entre este grupo exposto por 12 dias e o grupo basal². As atividades da SOD no rim (primordialmente) e fígado foram decisivas para esta diferenciação, neste caso devido à sua inibição nestes períodos.

Os peixes expostos ao tratamento Cu/Zn apresentaram diferenças significativas por todo o período de exposição em relação aos níveis basais e entre os períodos, o grupo exposto por 4 dias diferenciou-se dos demais. A atividade da SOD no rim foi primordial para esta distinção, pois a inibição da atividade ocorreu ao longo dos 12 dias.

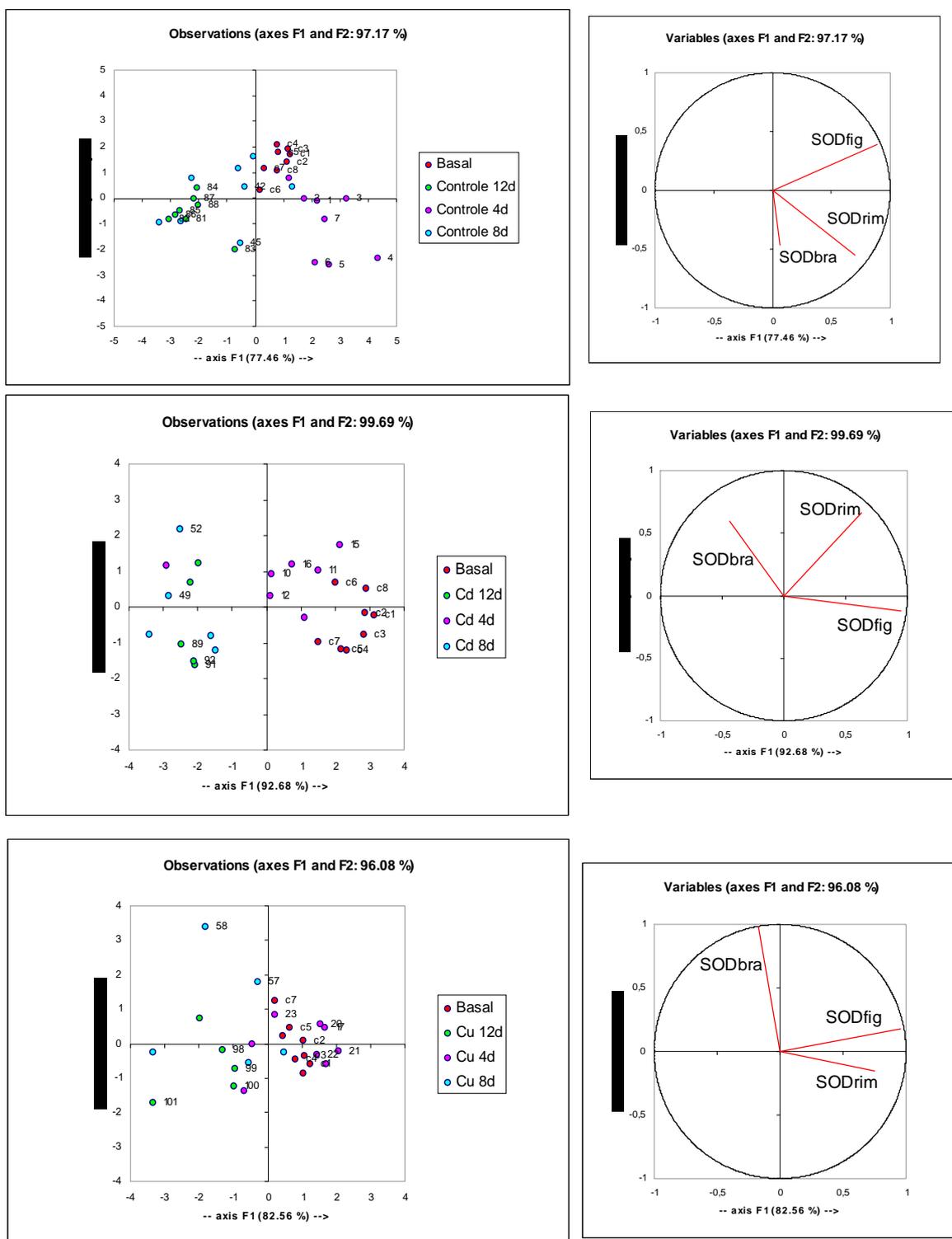


Figura 8: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

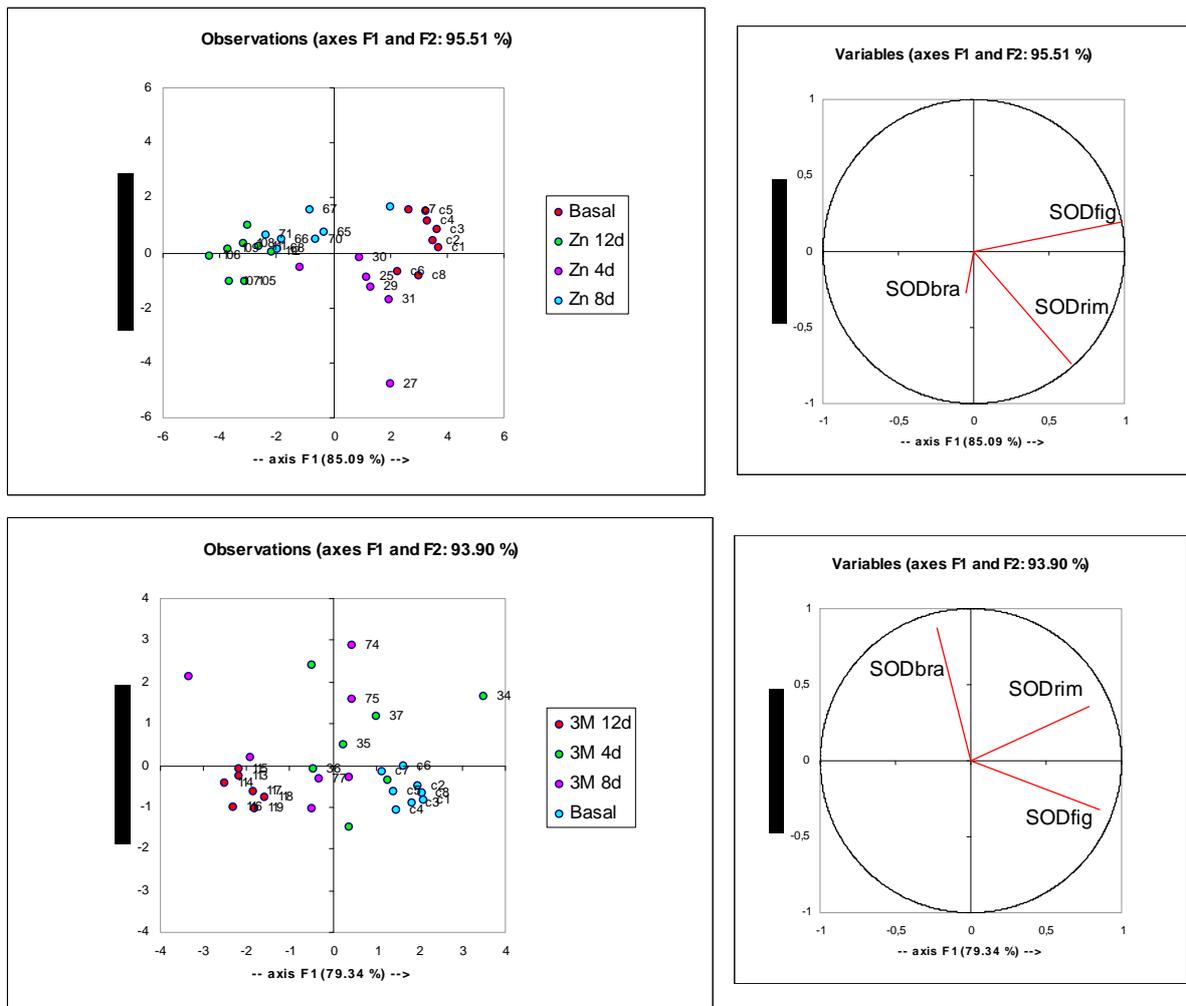


Figura 9: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

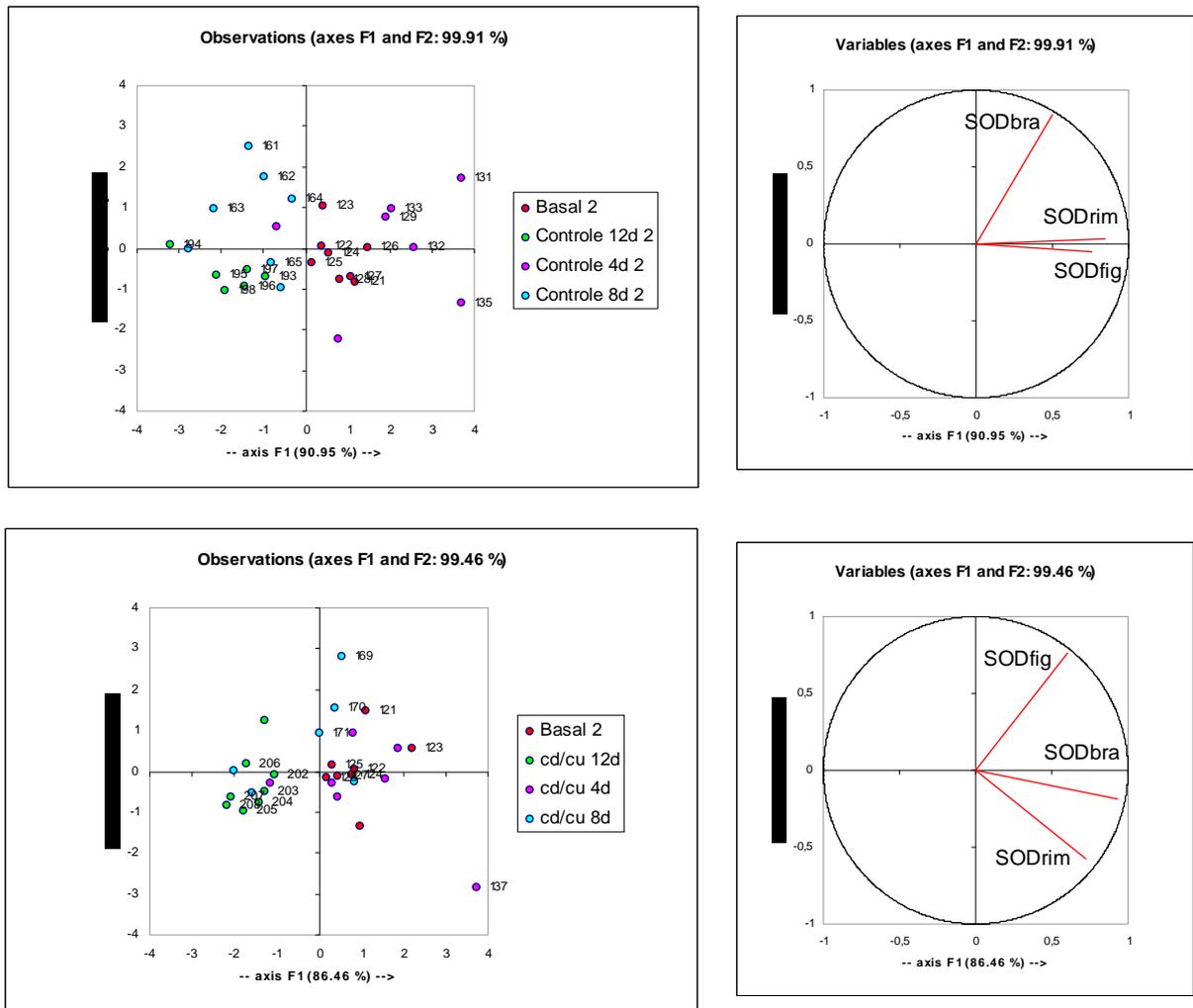


Figura 10: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

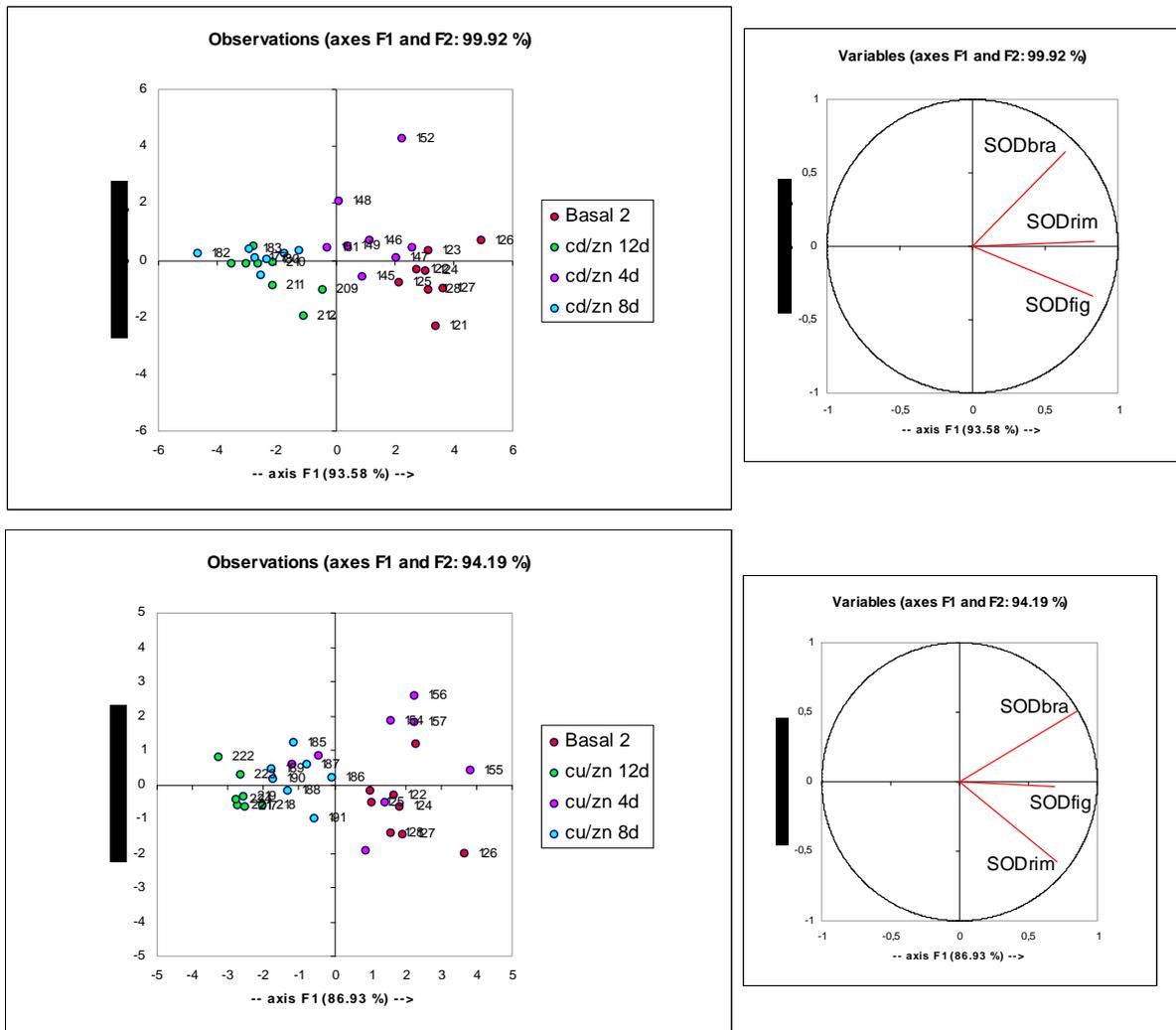


Figura 11: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

Ao compararmos os dados da análise discriminante para verificarmos as alterações entre diferentes tratamentos em um mesmo período (Figuras 12 e 13), observou-se que nos grupos do primeiro bioensaio (Figura 12) expostos por 4 dias, houve diferenças significativas entre o grupo controle e todos os tratamentos, sendo que as atividades da SOD no fígado e no rim foram determinantes para estas diferenças.

Nas exposições em 8 dias observou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e mesmo em relação ao controle. Em 12 dias de exposição, o controle diferenciou-se do grupo exposto aos três metais combinados e ao zinco. E os organismos expostos ao zinco também apresentaram diferenças significativas nas respostas frente aos grupos expostos ao cádmio e ao cobre. As atividades da SOD analisada nos rins e fígado foram as responsáveis pela diferenciação destes grupos e a atividade da SOD na brânquia foi importantes na diferença observada em relação à exposição ao cádmio. Observou-se que a atividade da SOD na brânquia apresentou aumento de sua atividade em alguns tratamentos com 12 dias de exposição, enquanto que para o fígado e rim ocorreu apenas inibição em todos os tratamentos.

Em relação às comparações para a exposição à dois metais em um mesmo período, observamos que, para 4 dias, não ocorreram diferenças significativas. Para 8 dias, observou-se diferenças significativas apenas entre os grupos. Para 12 dias ocorreu diferenças significativas entre todos os tratamentos e entre o tratamento Cu/Zn e o controle. A atividade da SOD na brânquia foi importante para estes dados observados.

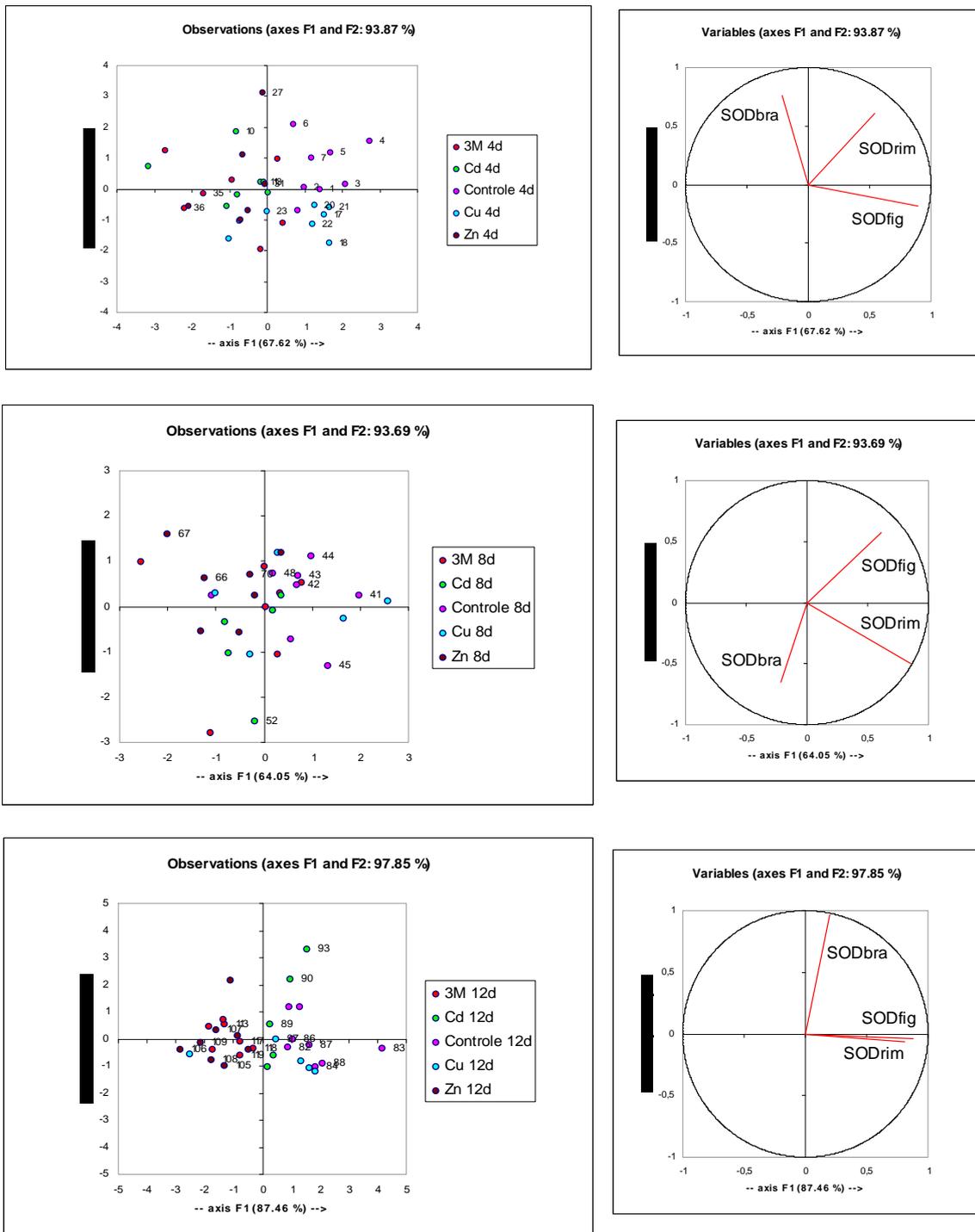


Figura 12: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

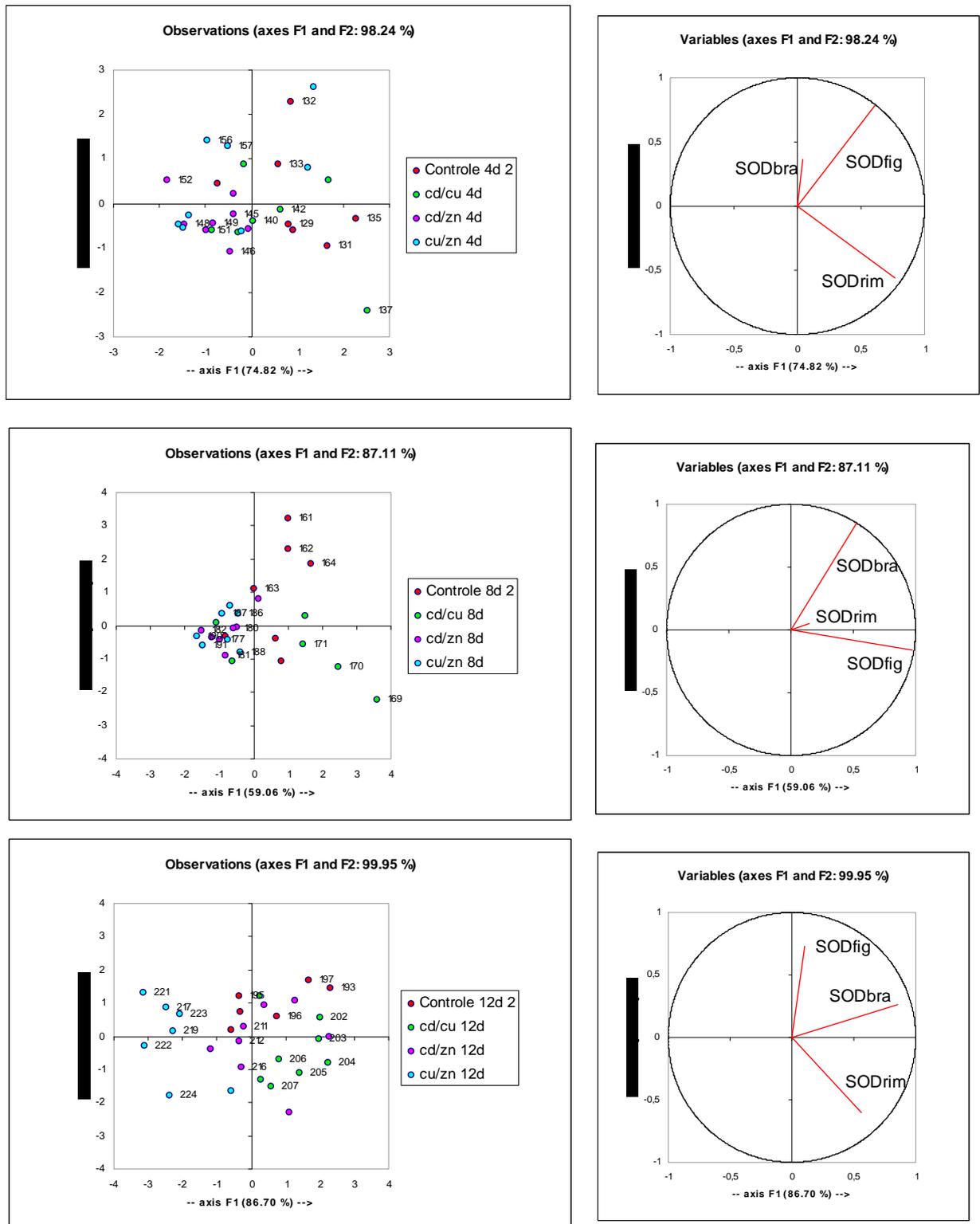


Figura 13: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a superóxido dismutase em brânquia, fígado e rim (SODbra, SODfig e SODrim) de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados obtidos para a atividade da catalase (CAT) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da CAT em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).

		Tratamento						
CAT Brânquia	Dias	Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	97,88	89,67	61,71	93,19	9,25	32,87	37,89
	8	26,24	9,30	28,04	37,52	6,67	2,10	5,04
	12	20,98	20,18	18,26	2,76	16,91	21,71	39,44
Ref. Basal	4	6,06	1,66	13,33	3,55	1,08	22,93	27,58
	8	20,09	1,75	22,04	32,32	15,87	6,34	3,15
	12	4,94	4,25	2,58	10,86	4,66	8,95	24,82
CAT Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	17,86	12,19	23,10	0,57	0,24	14,15	24,15
	8	76,99	9,77	7,39	17,53	21,48	14,49	11,37
	12	14,61	35,94	25,00	34,96	8,73	7,39	10,04
Ref. Basal	4	22,82	42,50	19,39	34,14	14,83	31,39	12,69
	8	12,87	42,46	31,51	47,41	6,87	16,38	20,62
	12	5,45	29,07	16,96	27,98	20,49	2,62	0,31
CAT Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	5,66	10,69	13,67	24,41	31,65	7,62	25,74
	8	7,80	16,79	5,62	7,05	4,10	25,24	6,05
	12	37,46	21,26	49,24	41,11	17,96	39,34	38,30
Ref. Basal	4	3,21	18,18	4,14	13,97	38,97	3,92	33,70
	8	26,34	6,70	15,62	25,74	9,86	43,47	7,63
	12	4,14	15,44	4,07	1,60	24,90	44,47	43,52

Para a catalase, observa-se que ocorreu inibição da sua atividade nas brânquias em 8 dias de exposição, em relação ao controle e aos tratamentos com metais isolados, com os três metais juntos e nos tratamentos Cd/Zn e Cu/Zn. Em relação ao nível basal, também nas brânquias, ocorreu inibição nos tratamentos com metais isolados e com os três metais combinados, sendo que neste último também ocorreu inibição em 12 dias de exposição. Nos demais tratamentos e períodos houve aumento da atividade da catalase.

Para o fígado, a atividade da catalase sofreu elevação em 4 dias de exposição aos três metais em conjunto e ao Cd e Zinco e em 4 e 8 dias de exposição para o Cd e para o Zn. Ocorreu elevação da atividade em 12 dias para a exposição aos metais Cd e Cu associados. Em relação aos níveis basais, houve inibição para os tratamentos com metais isolados e para os três metais combinados. Houve aumento da atividade em 4 dias para Cd e para Cu/Zn. Para os grupos Cd/Cu e Cd/Zn, em todos os períodos ocorreu elevação da atividade em relação aos valores basais.

Para o rim, ocorreu um aumento da atividade em 4 e 8 dias de exposição ao Cd e aos três metais associados. Ocorreu elevação da atividade da catalase em 8 e 12 dias para a exposição ao cobre. Em 4 e 8 dias de exposição, ocorreu aumento na atividade do grupo Cd/Zn. Nos demais grupos, houve inibição da atividade da enzima. Em relação ao grupo basal, a catalase teve inibição em todo o período para os tratamentos Cd e Cu. Em 4 e 8 dias teve elevação da atividade da CAT no rim, o grupo exposto ao Zn. Em 4 dias teve elevação da atividade apenas no grupo exposto aos três metais associados. Para Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn, ocorreu aumento na atividade da enzima apenas em 4 dias de exposição.

As Figuras 14, 15 e 16 representam os dados obtidos para as análises da CAT nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

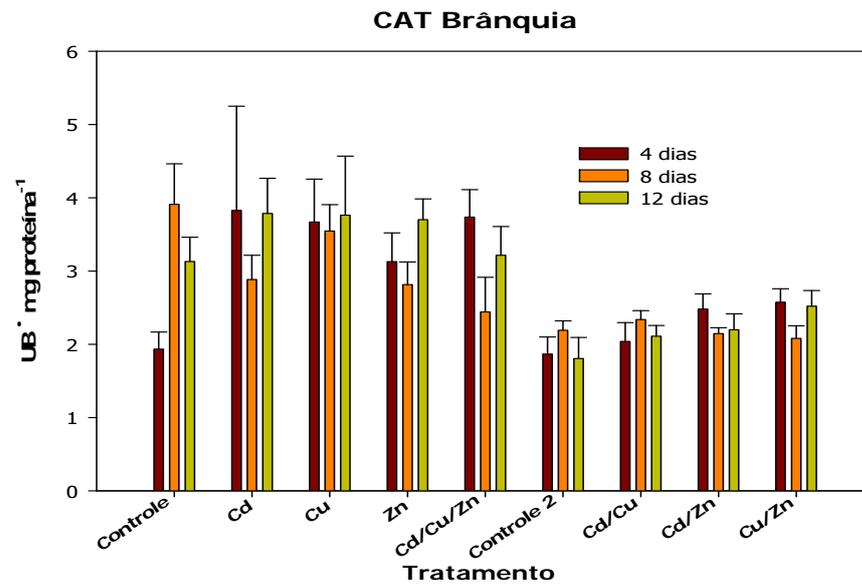


Figura 14: Atividade da catalase (CAT) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

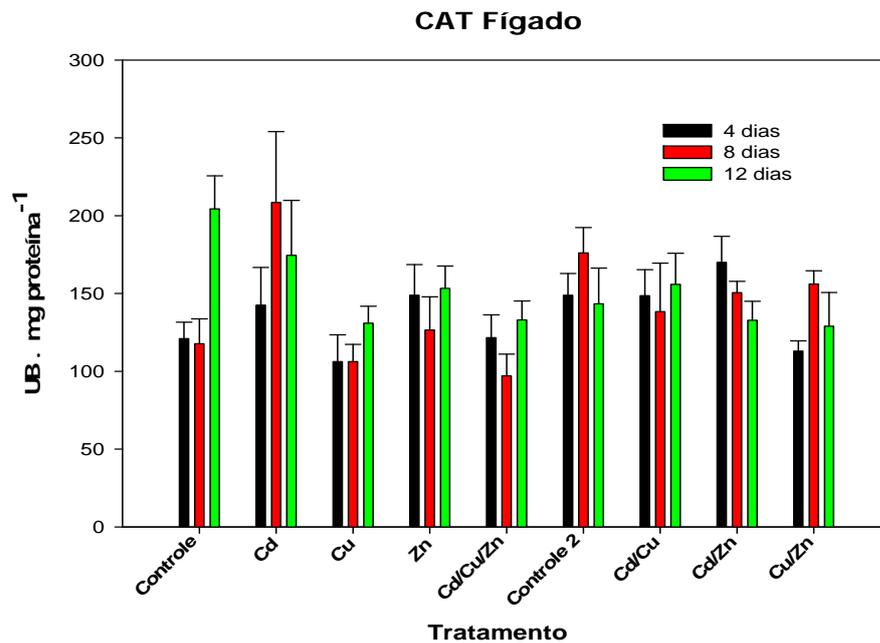


Figura 15: Atividade da catalase (CAT) no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

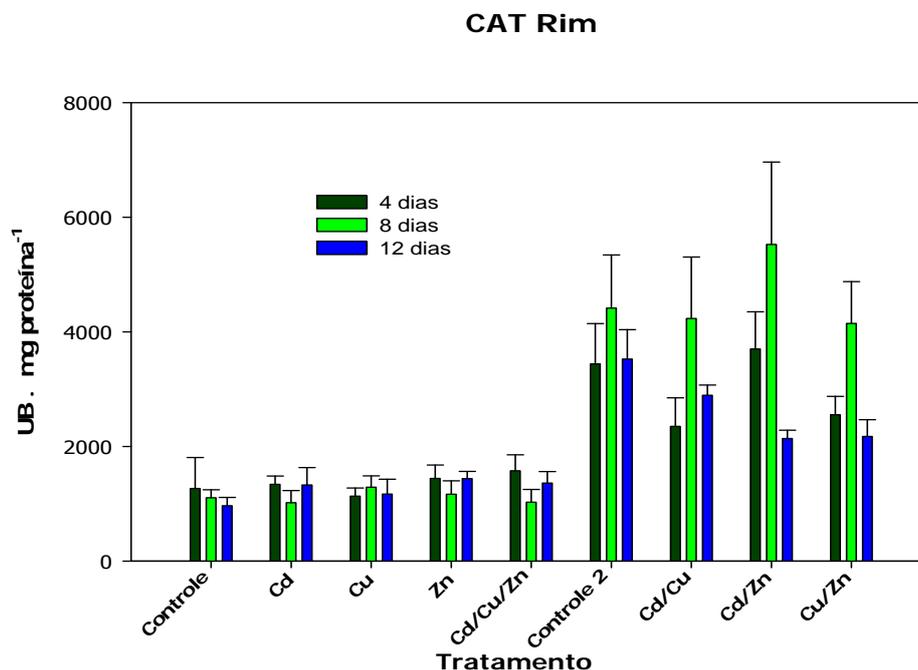


Figura 16 :Atividade da catalase (CAT) no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

Nas Figuras 17, 18, 19 e 20 são apresentados os dados para a análise discriminante em relação aos tratamentos ao longo do período de exposição. Para o primeiro bioensaio (Figuras 17 e 18) observou-se que para o grupo controle, apenas em 4 dias houve diferença significativa em relação ao grupo basal, devido a atividade da CAT do fígado)

Em relação à exposição ao cádmio, não há significativas diferenças entre os grupos. Para a exposição ao cobre por 4 dias ocorreu uma diferenciação de resposta em relação aos níveis basais, com alta relação com a atividade da CAT no fígado.

Para a exposição ao zinco ao longo dos 12 dias, observou-se que ocorreu significativa diferença apenas para os organismos expostos ao zinco por 8 dias, em relação aos níveis basais da atividade da CAT. A atividade da catalase no fígado foi a variável de maior peso para esta situação, sendo que ocorre intensa inibição da sua atividade. Para a exposição aos três metais combinados, em

relação ao período de exposição, ocorreu diferença significativa para a resposta desta enzima em 4 e 8 dias de exposição, em relação aos níveis basais de atividade. Estes grupos diferenciaram-se do grupo basal devido á atividade da CAT no fígado pois ocorreu sua inibição nestes 2 períodos.

Pelos resultados obtidos para as comparações nos tratamentos com dois metais combinados (Figuras 19 e 20) temos que para o controle, não ocorreram diferenças significativas deste grupo em relação aos níveis basais da atividade da CAT. Também não ocorreram diferenças significativas para a exposição ao cádmio e cobre juntos e para o cádmio e o zinco cominados, em relação aos níveis basais.

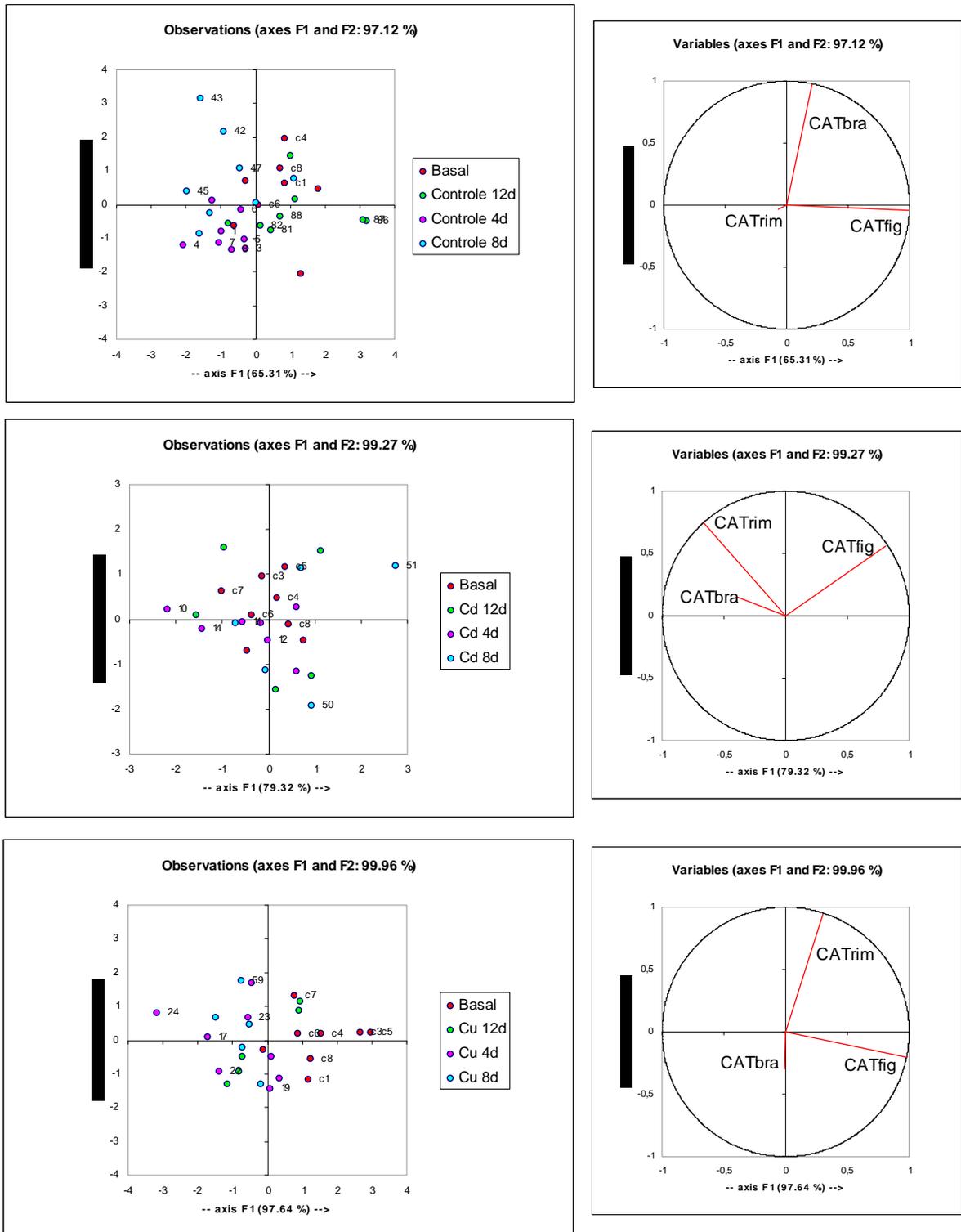


Figura 17: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

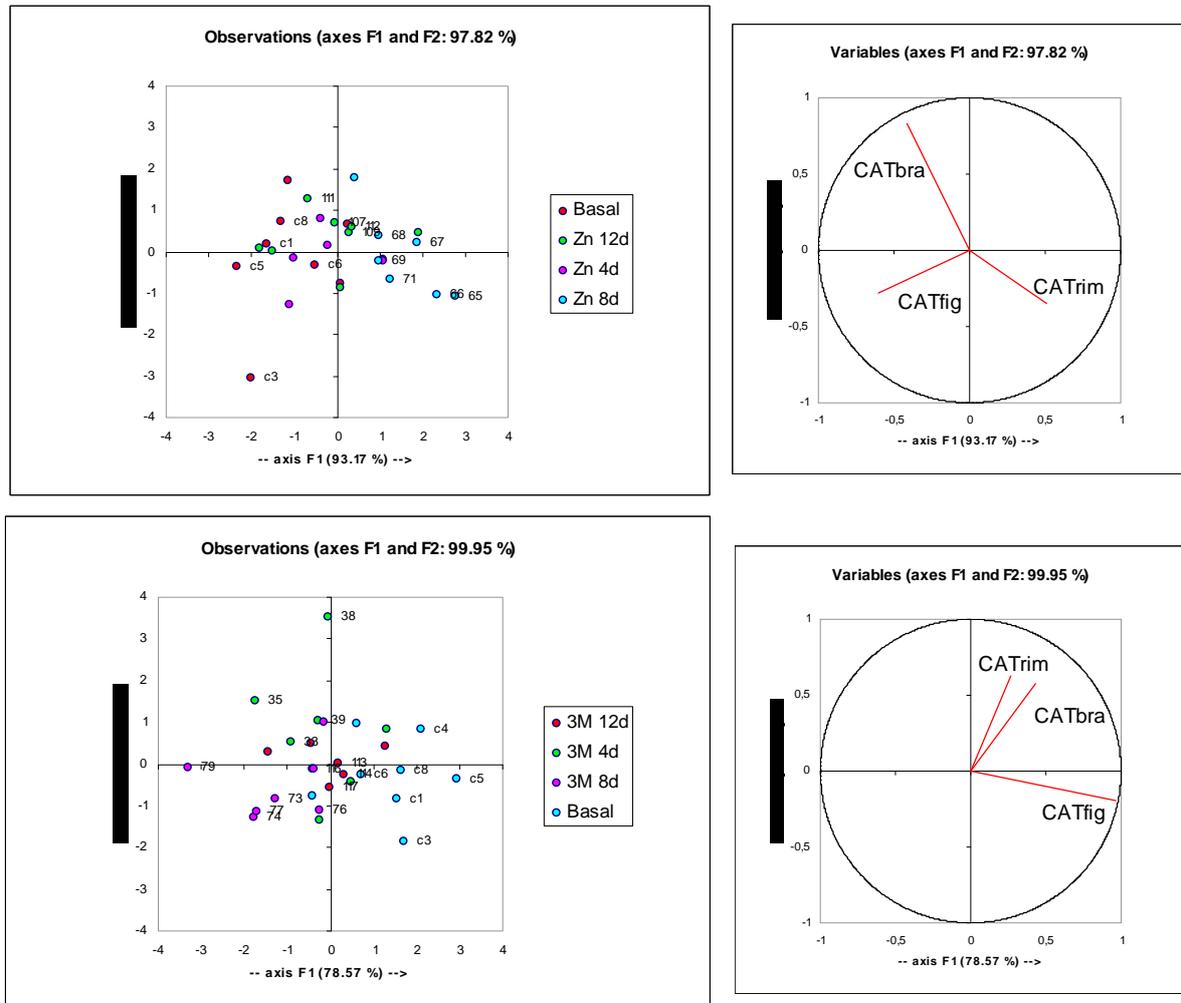


Figura 18: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

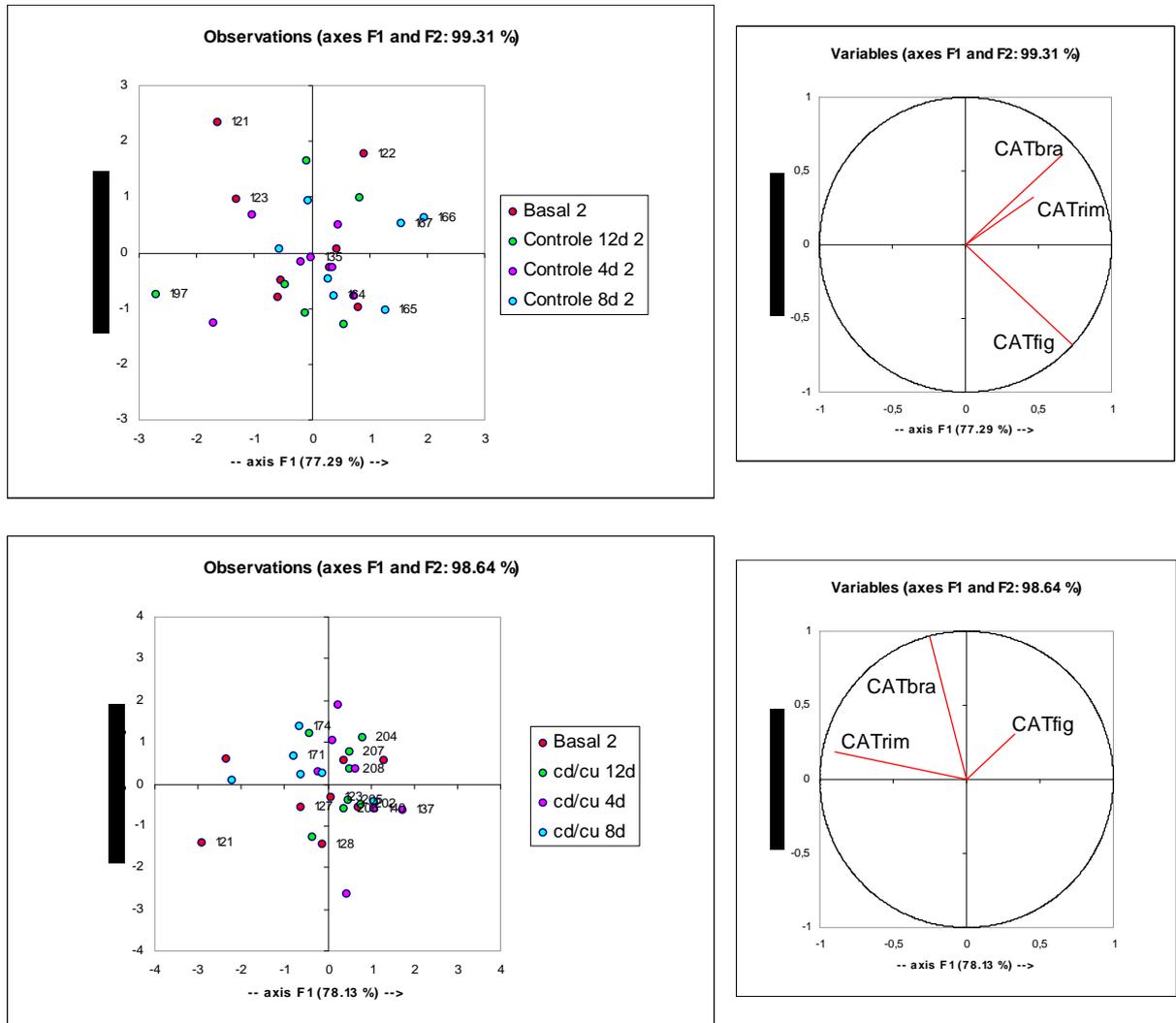


Figura 19: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

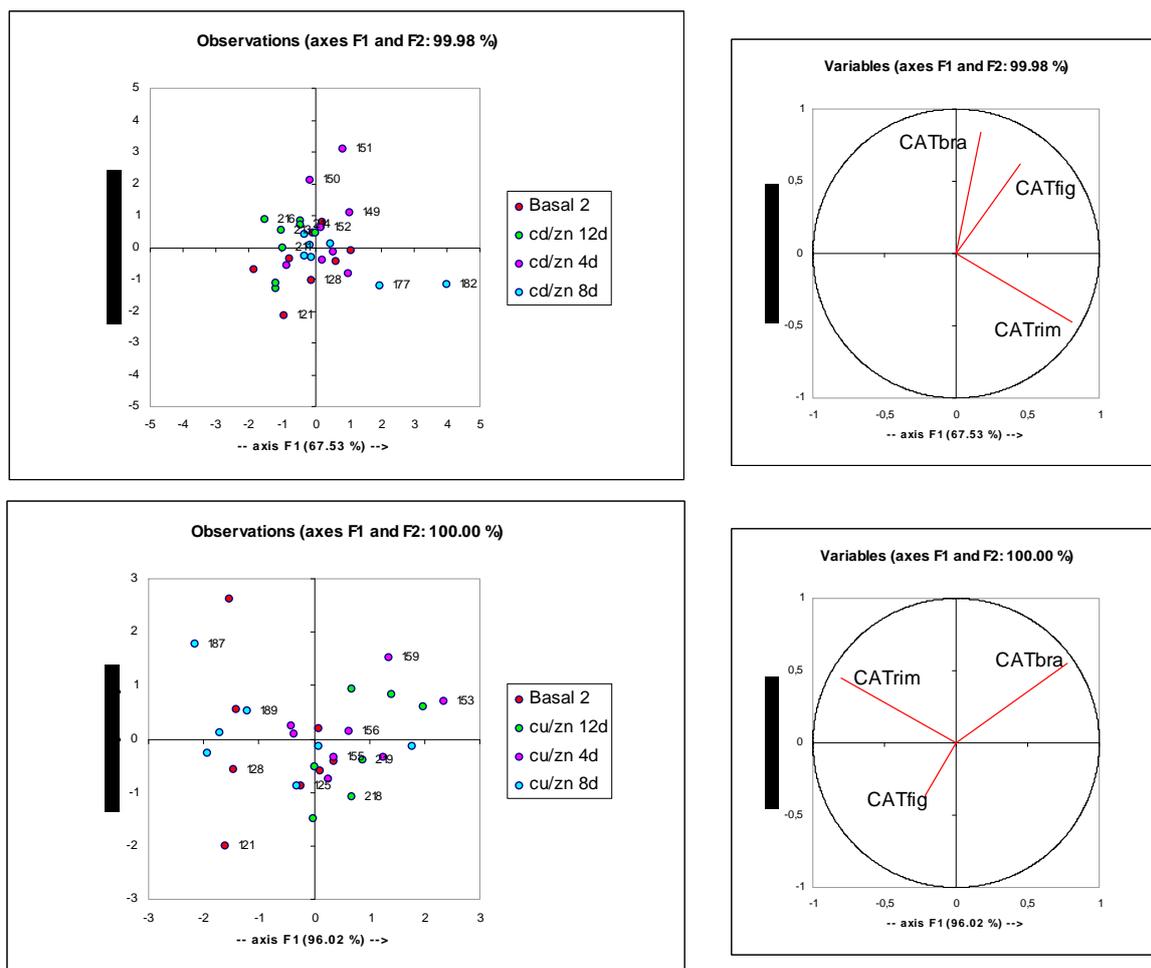


Figura 20: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

As análises discriminantes para diferentes tratamentos para um mesmo período estão apresentadas nas Figuras 21 e 22. Em referência ao primeiro bioensaio (Figura 21), no período de 4 e 8 dias, não ocorreram diferenças significativas entre os grupos e entre estes e o controle para a atividade da catalase. Em 12 dias, o grupo exposto ao zinco apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. A atividade da catalase no fígado foi importante para esta distinção.

Em relação ao segundo bioensaio (Figura 22), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e seus controles ou entre grupos expostos, em nenhum tratamento.

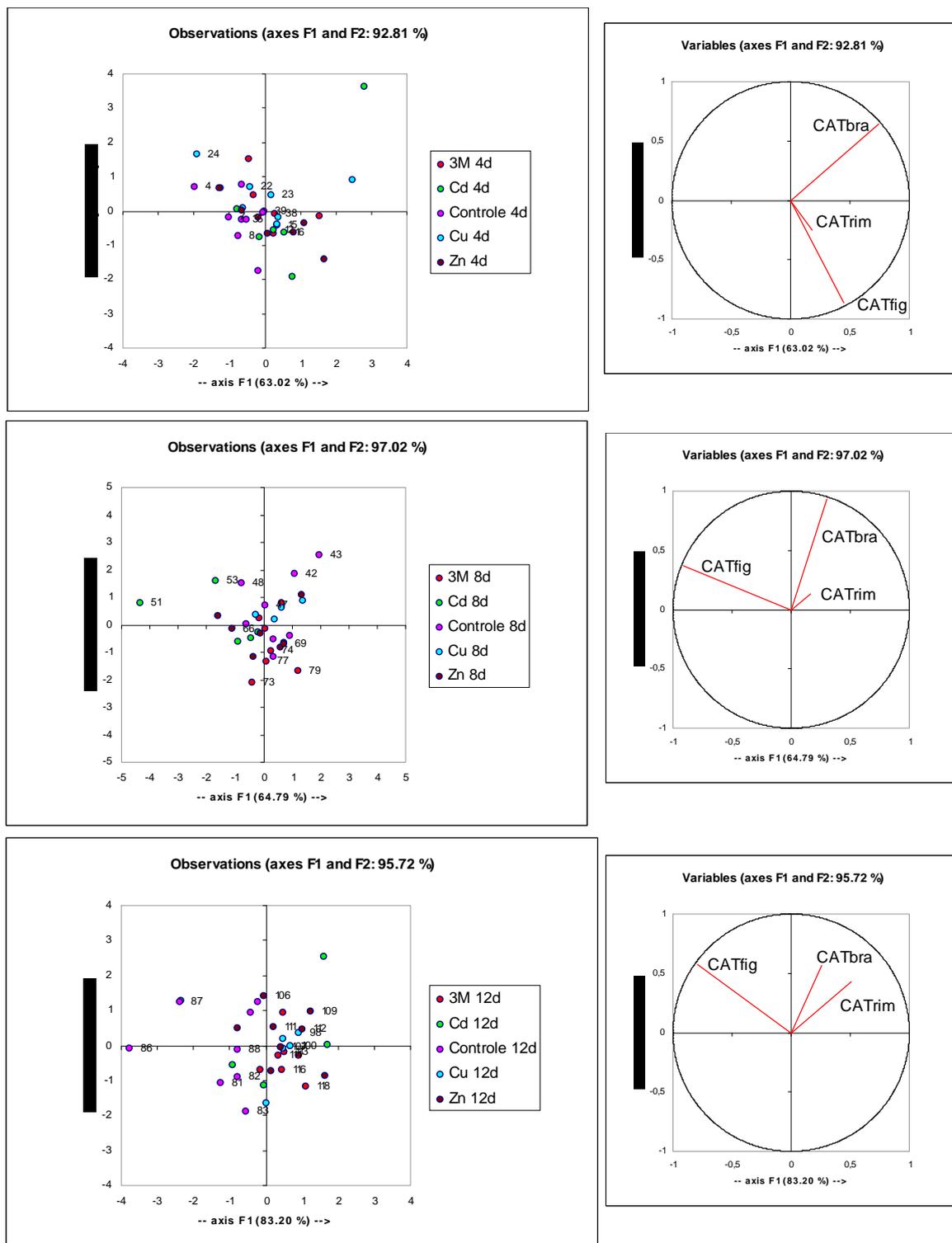


Figura 21: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

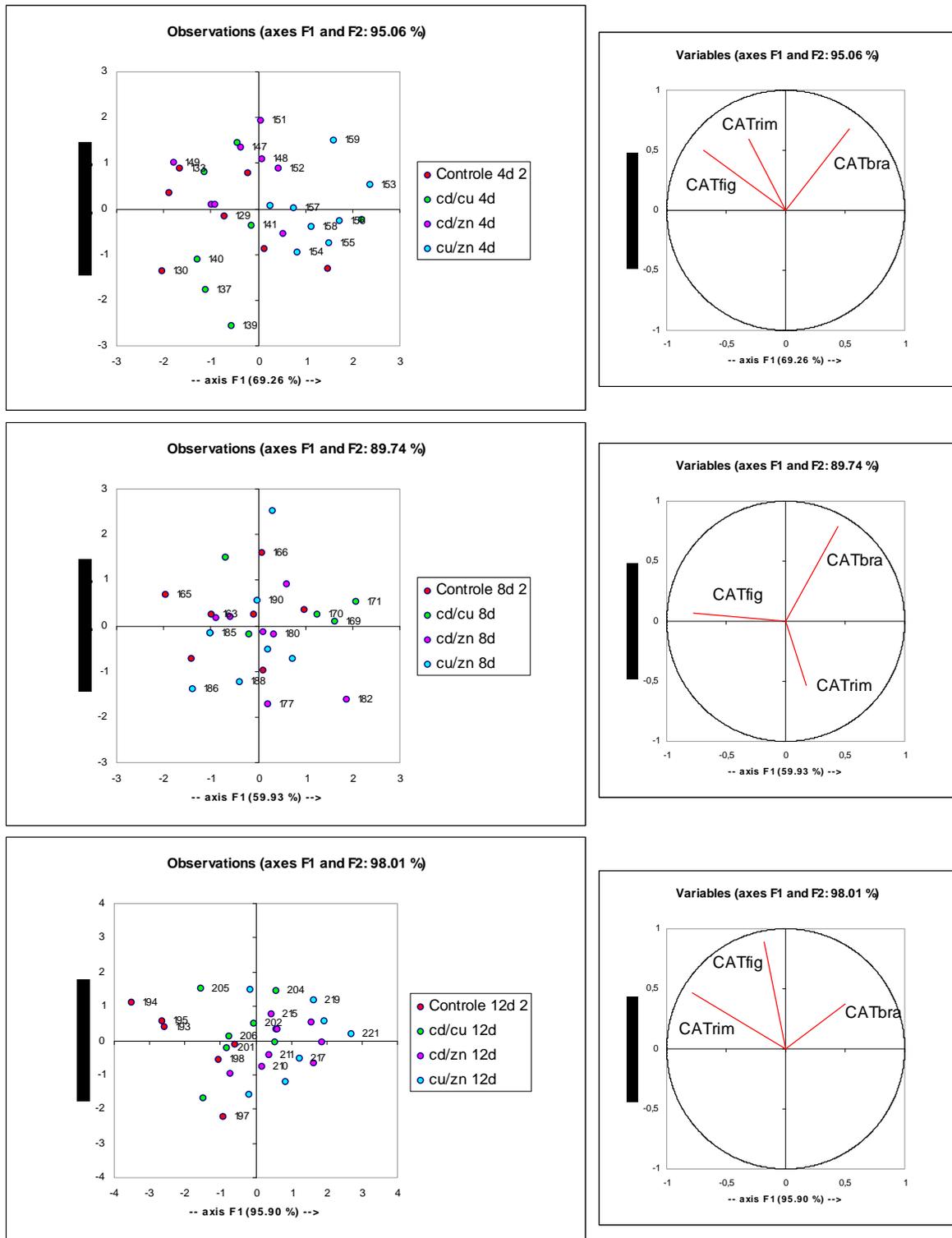


Figura 22: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a catalase em brânquia, fígado e rim (CATbra, CATfig e CATrim) de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados obtidos para a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da GPx em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).

		Tratamento						
GPx Brânquia	Dias	Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	2.40	35.39	23.16	29.18	6.19	2.11	12.99
	8	11.21	10.80	4.32	0.04	19.14	25.20	14.19
	12	15.64	10.59	5.11	4.09	2.53	1.07	19.39
Ref. Basal	4	21.45	23.38	8.87	16.01	18.24	28.71	42.41
	8	3.43	22.53	16.91	13.12	15.99	7.30	23.09
	12	14.16	33.63	29.56	28.80	31.85	27.23	3.67
GPx Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	4.40	0.34	7.43	3.96	6.21	15.91	6.74
	8	0.81	15.73	11.72	33.46	30.83	9.19	7.57
	12	8.40	4.07	24.10	42.29	17.33	25.28	11.67
Ref. Basal	4	43.79	37.25	27.49	32.27	0.71	9.70	14.62
	8	38.07	61.10	55.51	85.78	37.59	4.50	2.80
	12	81.22	60.36	26.89	3.52	9.28	1.22	16.76
GPx Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	39.56	30.95	23.36	30.85	0.64	23.94	25.67
	8	1.28	23.32	0.79	21.37	2.81	11.64	3.42
	12	16.56	15.78	26.23	26.10	10.30	17.40	7.58
Ref. Basal	4	4.56	19.46	32.58	19.62	25.25	5.33	7.49
	8	16.66	1.47	18.37	0.14	8.40	21.27	7.85
	12	14.10	15.16	0.87	1.05	8.74	2.87	10.99

Pelos resultados obtidos para a GPx nas brânquias de *O. niloticus* observou-se que há elevação na sua atividade para o tratamento ao Cd, ao longo de todo o experimento, em relação ao controle. Houve inibição ao longo de todo experimento para o grupo exposto ao cobre e ao zinco. Ocorreu aumento da atividade da GPx em 8 dias apenas, para o grupo exposto aos três metais. Para a exposição ao Cd e Cu, houve aumento apenas em 12 dias e ocorreu inibição da GPx em 8 e 12 dias de exposição para os grupos Cd/Zn e Cu/Zn. Em relação aos níveis basais, ocorreu aumento da atividade da GPx para o grupo Cd em 4 dias e em todo o período de experimento para os grupos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Nos demais grupos, ocorreu inibição da atividade GPx nas brânquias.

No fígado, em relação ao controle ocorreu inibição da atividade da GPx em 4, 8 e 12 dias para o tratamento Cd/Zn. Na exposição ao Cd houve inibição apenas em 8 dias de exposição. Para os demais tratamentos ocorreu aumento da atividade da GPx em 8 dias. Para os tratamentos em relação aos níveis basais, constatou-se que ocorreu aumento da atividade da GPx no fígado quando *O. niloticus* foi exposta ao Cd, Cu, Zn e ao Cd/Cu. Ocorreu aumento da atividade em exposição aos três metais combinados em 4 e 8 dias e em 4 e 12 dias para Cu/Zn.

Para a atividade da GPx no rim, em relação ao controle, em 4, 8 e 12 dias ocorreu inibição no tratamento Cd/Zn e Cu/Zn e aumento da atividade em Cu. Em 4 e 12 dias ocorreu aumento da atividade em Cd, Zn e na exposição aos três metais associados. Na exposição ao Cd e Cu, ocorreu inibição da atividade da GPx em 8 e 12 dias.

As Figuras 23, 24 e 25 representam os dados obtidos para as análises da GPx nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

GPx Brânquia

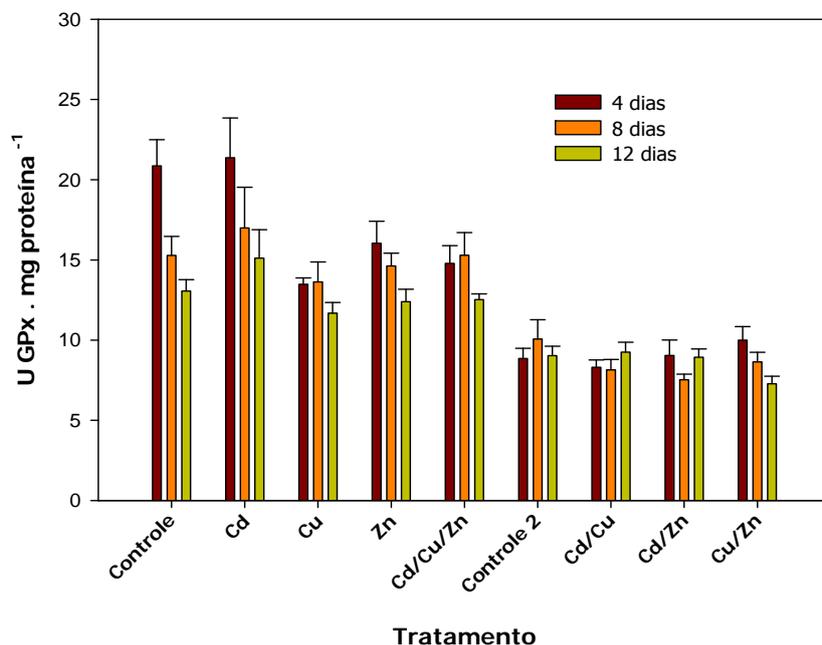


Figura 23: Atividade da glutatona peroxidase (GPx) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos em média \pm SEM.

GPx Fígado

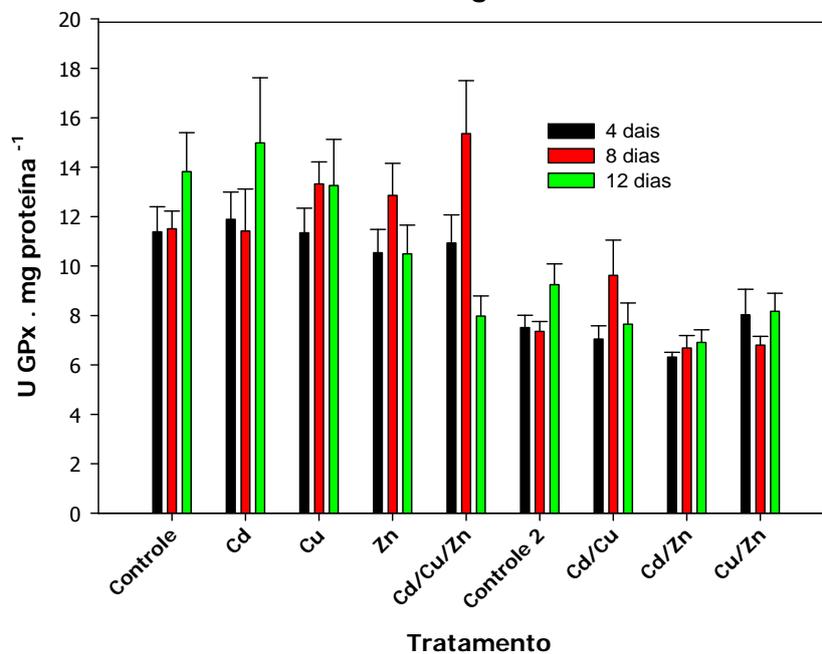


Figura 24: Atividade da glutatona peroxidase (GPx) no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

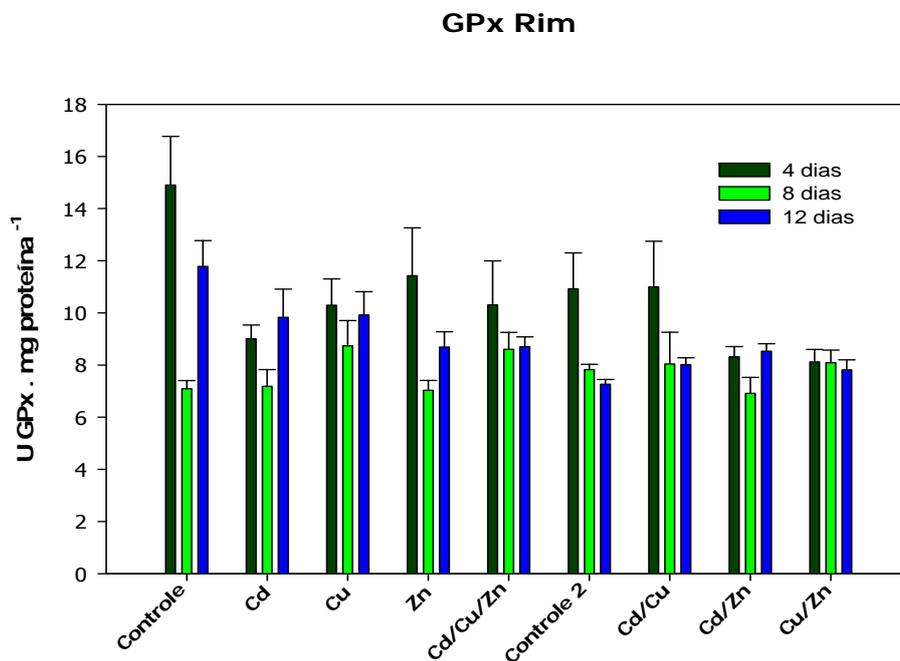


Figura 25: Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

Na análise dos tratamentos em diferentes períodos (Figuras 26, 27, 28 e 29) observou-se que para o primeiro bioensaio (Figura 26 e 27), os controles de 4 e 12 dias apresentaram diferenças em relação aos níveis basais da atividade da GPx. Além disso todos os controles apresentaram diferenças significativas entre si nos períodos, embora discretas, evidenciada pela atividade da GPx no rim. Quando expostos ao cádmio, os organismos apresentaram diferenças apenas em 12 dias, em relação aos níveis basais da atividade da GPx. Os níveis de atividade da GPx em fígado principalmente e no rim foram determinantes para estas diferenças. Não houve diferenças significativas entre os períodos de exposição. Em relação à exposição ao cobre, todos os períodos apresentaram respostas à exposição, que se diferenciaram significativamente em relação ao nível basal de atividade da GPx. A atividade da GPx no nas brânquias e no fígado de *O. niloticus* foram importantes para os resultados observados.

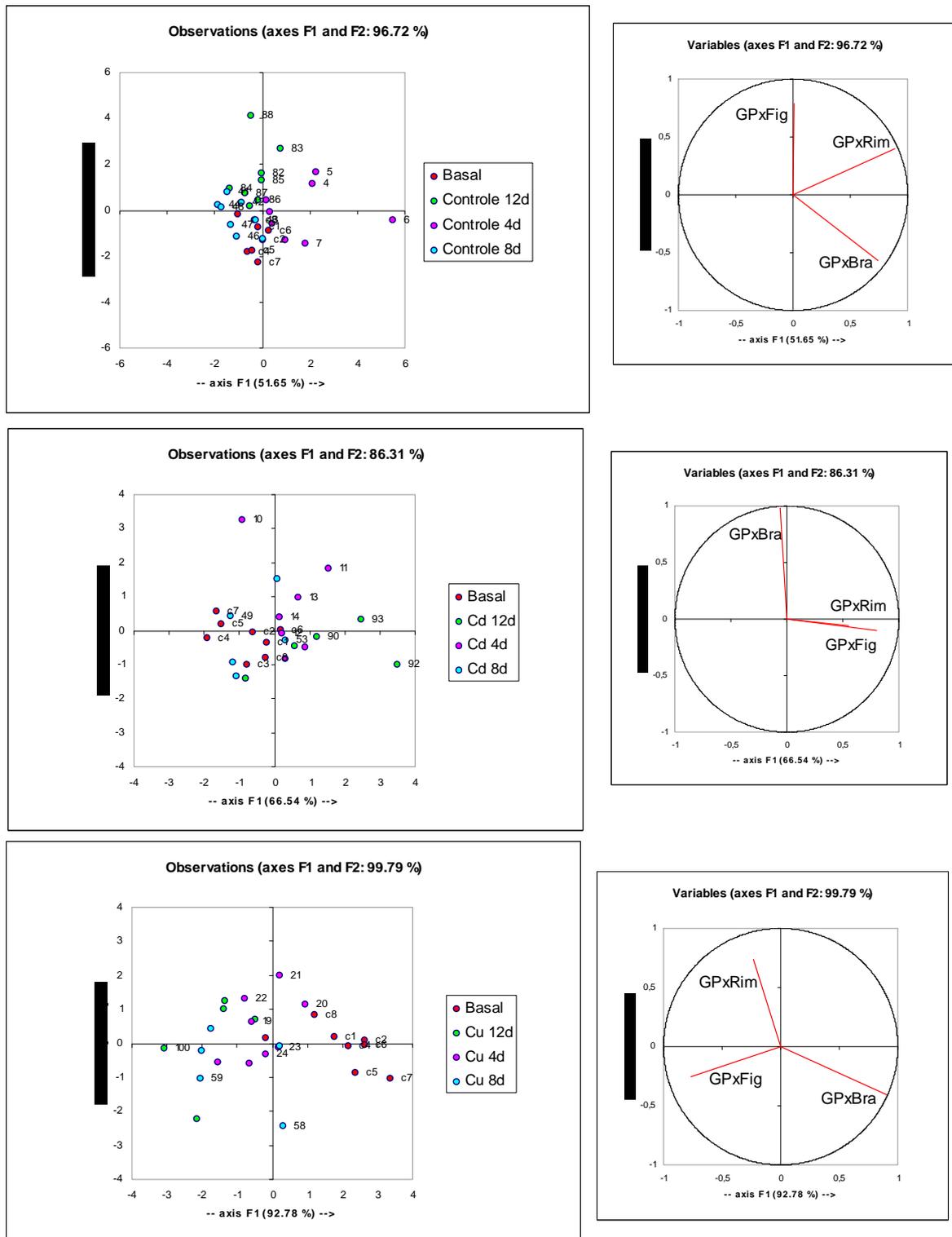


Figura 26: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

Em relação ao zinco, somente os peixes expostos por 8 e 12 dias tiveram alterações significativas em relação aos níveis basais da atividade da GPx. A atividade da GPx em brânquias foi importante para esta discriminação. Isto pelo fato de ocorrer inibição pelos 12 dias na brânquia. Para a exposição aos três metais combinados, houve diferenças significativas na resposta dos peixes expostos aos metais por 8 e 12 dias, em relação aos níveis basais. Também ocorreram diferenças significativas entre os peixes expostos por de 8 e 12 dias de exposição. A atividade da GPx em brânquias e no fígado foi determinante para estes comportamentos, pois ocorreu inibição na brânquia e intensa atividade no fígado em 8 dias de exposição.

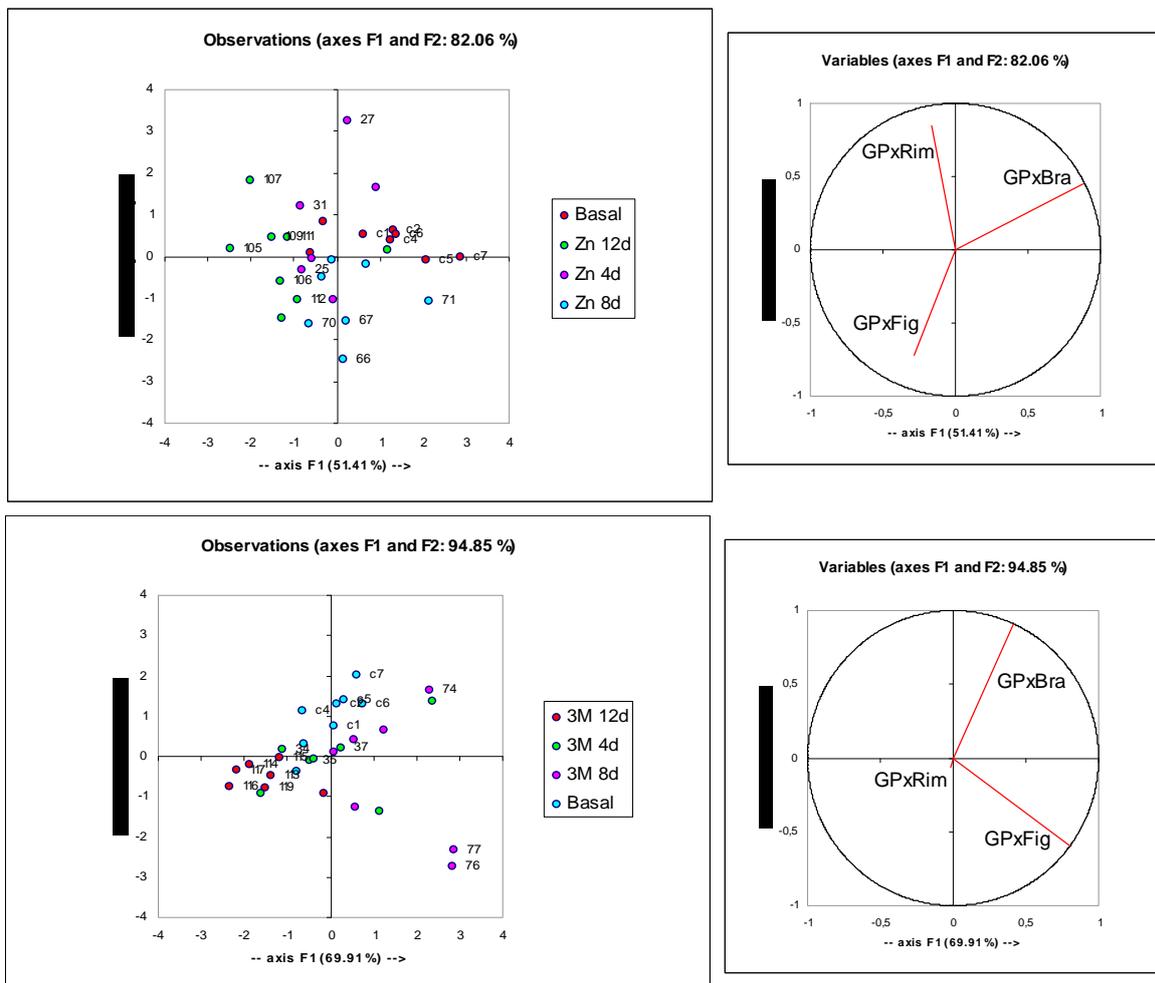


Figura 27: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

As Figuras 28 e 29 apresentam os resultados referentes à exposição aos metais combinados dois à dois, em relação ao período de 12 dias de experimentos. Pelos resultados observou-se que não há diferenças significativas entre os controles e os níveis basais da atividade da GPx nos tecidos analisados em cada período.

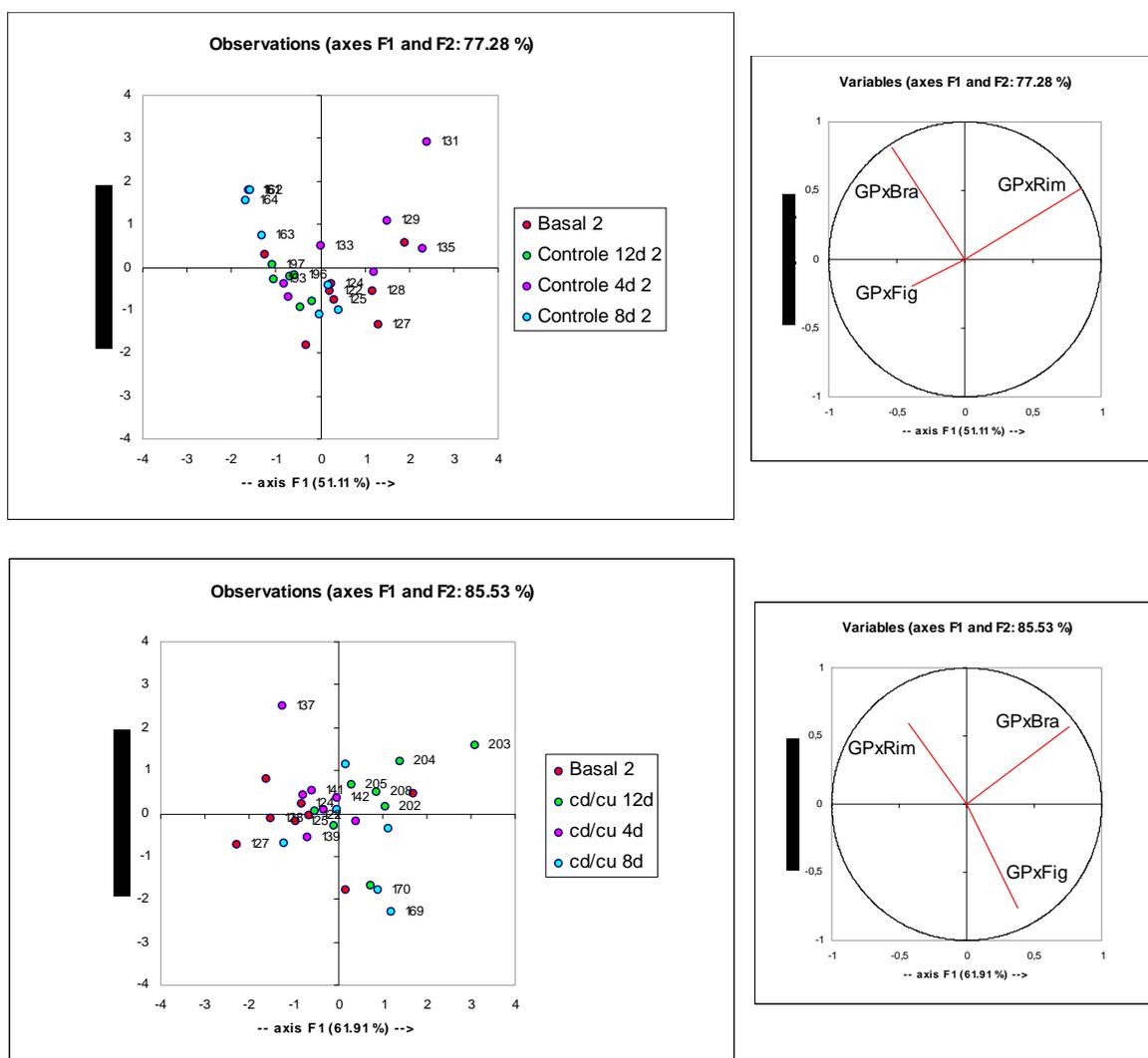


Figura 28: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutationa peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

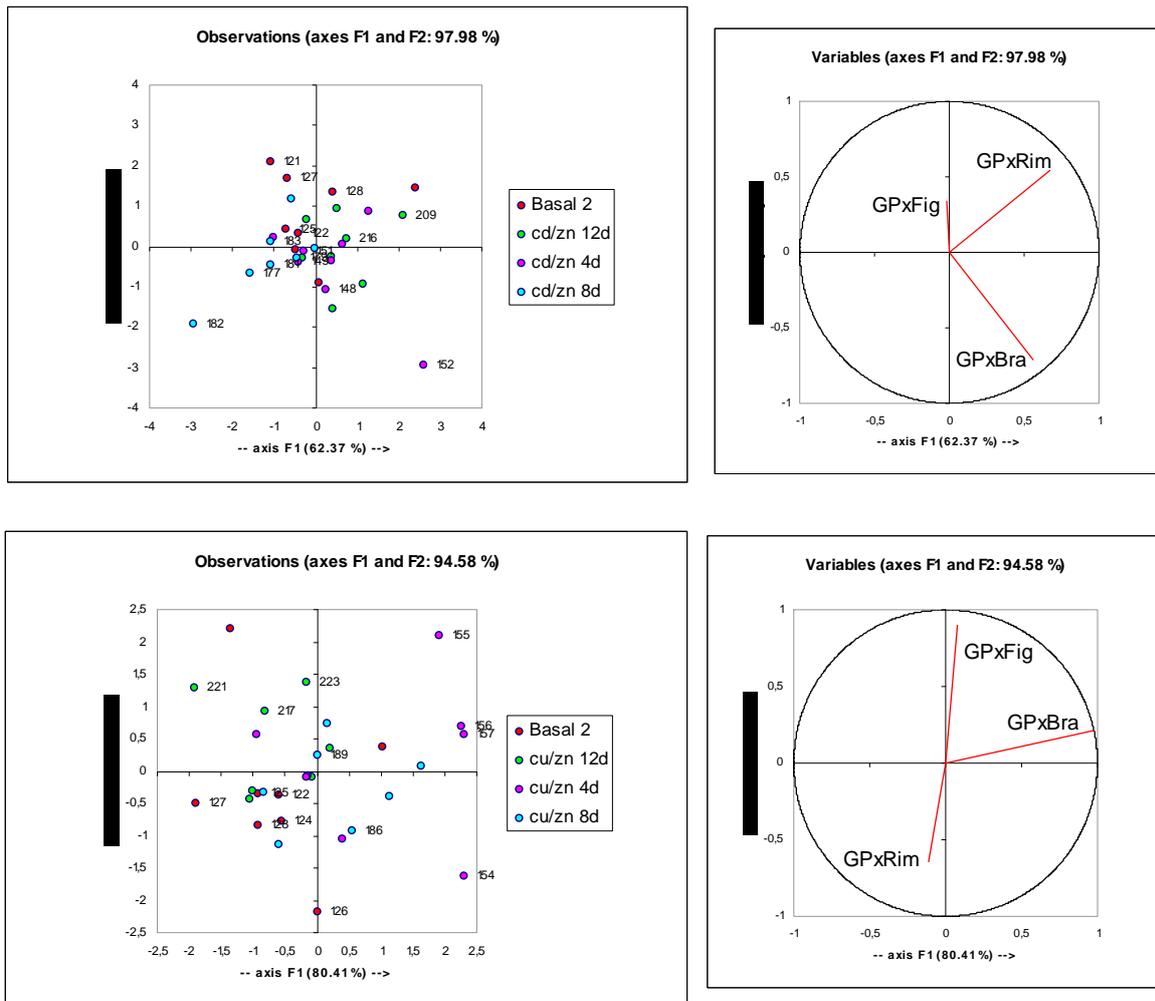


Figura 29: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutaciona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

As Figuras 30 e 31 apresentam os resultados da análise discriminante para os tratamentos em relação ao mesmo período de exposição. Para o primeiro bioensaio (Figura 28), para 4 dias de exposição, há apenas a discriminação do grupo controle em relação ao grupo exposto ao cobre. Há também diferenças significativas entre o grupo Cu e o grupo Cd. A variável responsável por esta distribuição foi a atividade da GPx na brânquia.

Na exposição por 8 dias, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Para o período de 12 dias há somente diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo exposto aos três metais combinados, bem como em relação ao grupo exposto ao zinco. A atividade da GPx no fígado foi importante para a determinação das respostas observadas.

Para o segundo bioensaio (Figura 31), houve uma clara distinção entre o grupo exposto aos metais cobre e zinco em conjunto, em relação ao controle em 4 dias de exposição. O fator principal foi a atividade da GPx nas brânquias de *O. niloticus*. Em 8 dias não ocorreu diferença significativa entre os grupos experimentais. Já para 12 dias, houve diferença significativa entre o grupo exposto aos metais cádmio e zinco em relação ao controle. As atividades da GPx do rim e fígado foram responsáveis, respectivamente, por esta diferenciação, já que ocorreu elevação da atividade da enzima no primeiro caso e inibição no segunda caso.

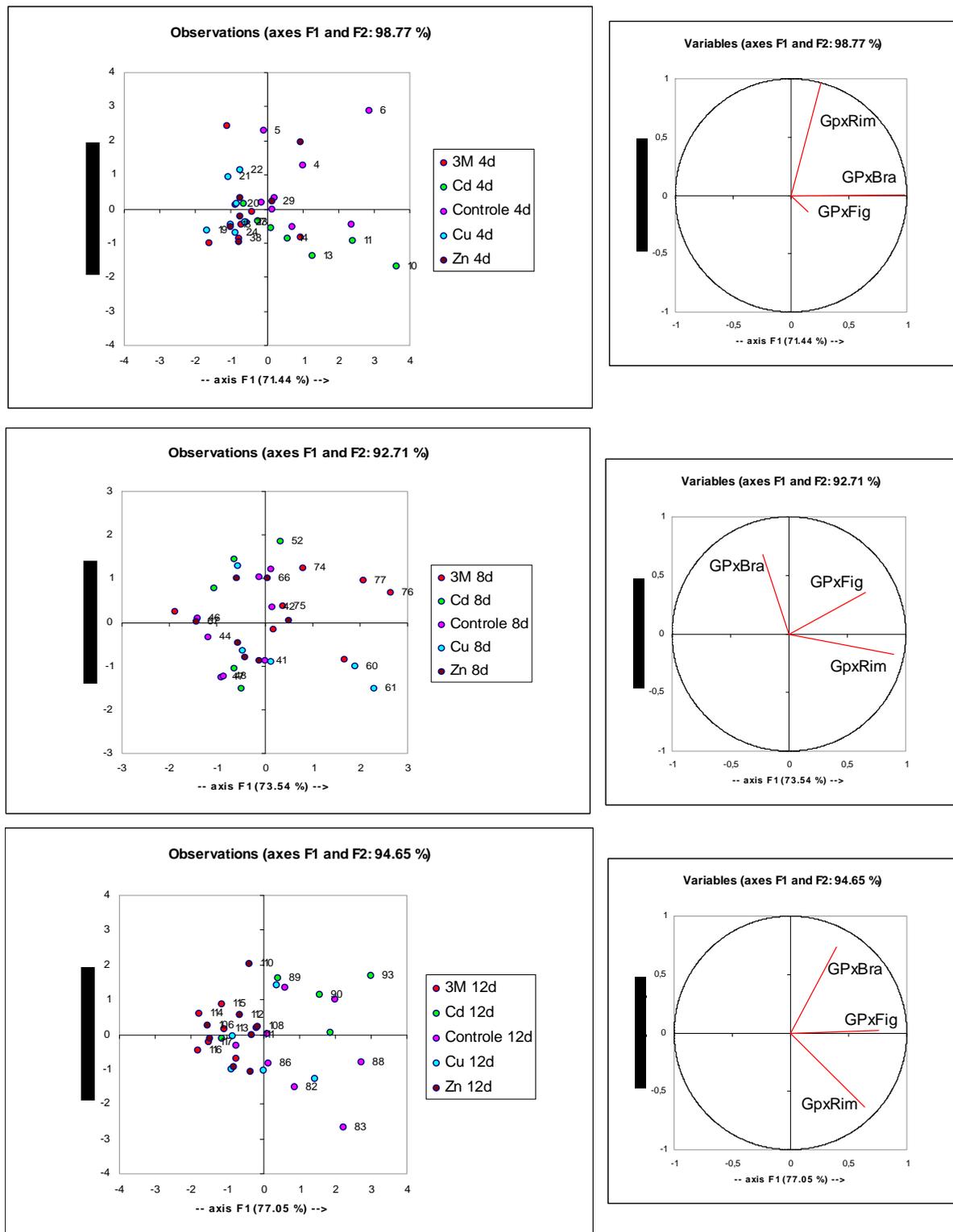


Figura 30: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

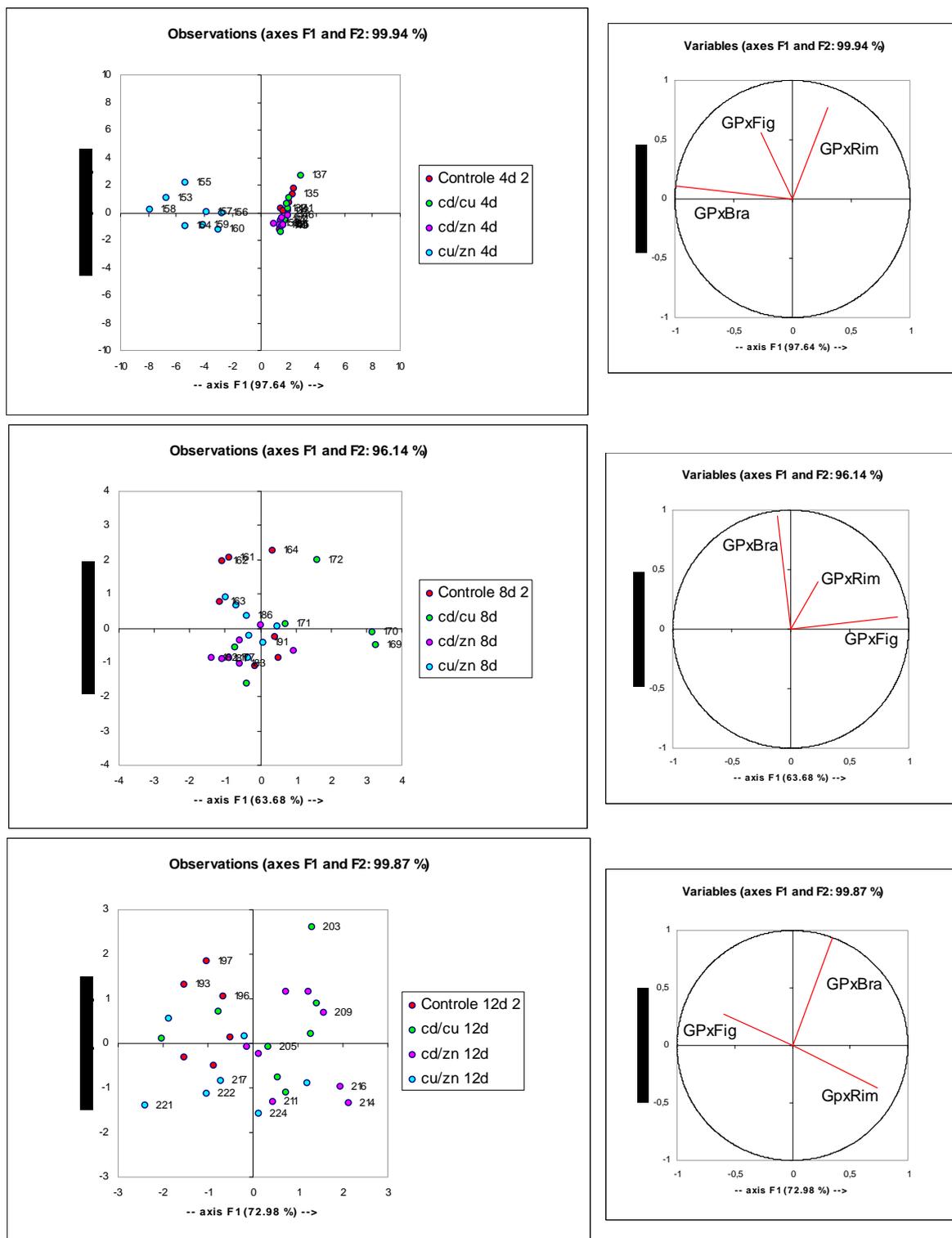


Figura 31: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona peroxidase em brânquia, fígado e rim (GPxBra, GPxFig e GPxRim) de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados obtidos para os níveis de hidroperoxidação (HP) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Padrão de elevação (preto) ou diminuição (vermelho) dos níveis de HP em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações (valores expressos em porcentagem).

		Tratamento						
HP Brânquia	Dias	Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	10.84	46.84	25.14	43.46	62.60	65.74	49.91
	8	19.05	9.87	8.05	2.60	14.53	12.30	7.53
	12	5.44	13.19	20.32	21.40	10.05	17.87	40.60
Ref. Basal	4	95.50	6.24	32.05	0.28	49.20	36.65	99.80
	8	67.03	26.46	29.01	43.96	12.32	15.25	41.30
	12	36.13	12.07	2.86	1.48	49.69	36.69	1.15
HP Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	21.32	90.43	16.38	126.64	11.16	0.96	13.07
	8	37.95	29.98	28.78	125.07	14.49	14.64	14.62
	12	56.44	3.73	59.17	96.16	21.07	29.20	36.44
Ref. Basal	4	45.75	31.31	19.75	56.28	41.58	46.94	54.31
	8	66.67	30.18	30.83	20.89	43.63	43.73	24.44
	12	72.69	39.64	74.40	22.99	25.36	33.05	39.89
HP Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	28.64	17.87	7.05	15.62	4.75	20.72	24.16
	8	0.66	6.35	4.06	10.99	2.15	13.55	1.78
	12	12.84	13.53	27.46	26.70	10.44	17.27	8.75
Ref. Basal	4	10.45	3.06	16.65	5.89	54.26	16.75	11.69
	8	7.08	0.53	10.26	3.81	8.81	3.87	13.17
	12	15.50	14.59	3.87	2.87	11.02	17.89	9.32

Em relação ao controle, os níveis de HP nas brânquias encontrados nos tratamentos Cu, Zn e Cd/Zn demonstraram haver diminuição em relação ao controle. Já para os tratamentos Cu/Zn e Cd/Cu/Zn ocorreu aumento dos níveis de HP em 8 dias de exposição. E ocorreu aumento nos níveis de HP na exposição ao Cd por todo o experimento relação aos níveis basais, ocorreu diminuição nos

níveis de HP apenas para o tratamento Cu/Zn em 12 dias. Para todos os demais tratamentos e períodos ocorreu uma intensa elevação dos níveis de HP, que chegaram até a 2190%. (Exposição ao Cd).

Para os níveis de HP encontrados no fígado de *O. niloticus* constata-se que houve diminuição em relação ao grupo controle na exposição ao Cd, ao longo dos 12 dias de experimento. Para a exposição ao cobre e ao zinco, ocorreu elevação em 4 e 8 dias e inibição aos 12 dias. Na exposição aos três metais combinados, ocorreu significativo aumento dos níveis de HP em 4, 8 e 12 dias, em relação ao controle (126,64% em 4 dias de exposição). Nos tratamentos Cd/Cu e Cd/Zn, ocorreu aumento dos níveis de HP somente em 4 dias de exposição. No tratamento Cu/Zn houve elevação dos níveis de Hp somente em 4 dias de exposição. Em comparação aos níveis basais, também ocorreu diminuição de HP no tratamento Cd e ocorreu o mesmo em Zn, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Na exposição ao cobre ocorreu elevação dos níveis de HP apenas em 4 dias e na exposição aos três metais combinados, ocorreu elevação dos níveis de HP por todo o experimento.

Para o rim observa-se que, em relação ao controle, houve inibição dos níveis de HP ao longo de todo o período de exposição para os grupos Cd e Zn. Para os tratamentos Cu e Cd/Cu/Zn ocorreu elevação dos níveis de HP apenas em 8 dias de exposição. Para Cd/Cu, a exposição diminuiu os níveis de HP apenas em 8 dias. Para Cd/Zn ocorreu aumento dos níveis de HP apenas em 12 dias. E para Cu/Zn ocorreu inibição nos níveis de HP em 4 dias de exposição. Para as comparações em relação ao grupo basal, temos que para o grupo exposto ao cádmio ocorreu elevação nos níveis de HP em 12 dias de exposição. Para o grupo Cd e Cd/Zn houve inibição da HP em 4 e 12 dias. Para o Zn ocorreu aumento nos níveis de HP em 4 dias e para a exposição aos três metais associados, ocorreu inibição em 12 dias de exposição. Para o Cd/Cu e para Cu/Zn, ocorreu aumento dos níveis de HP por todo o período de exposição.

As Figuras 32, 33 e 34 representam os dados obtidos para as análises da SOD nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

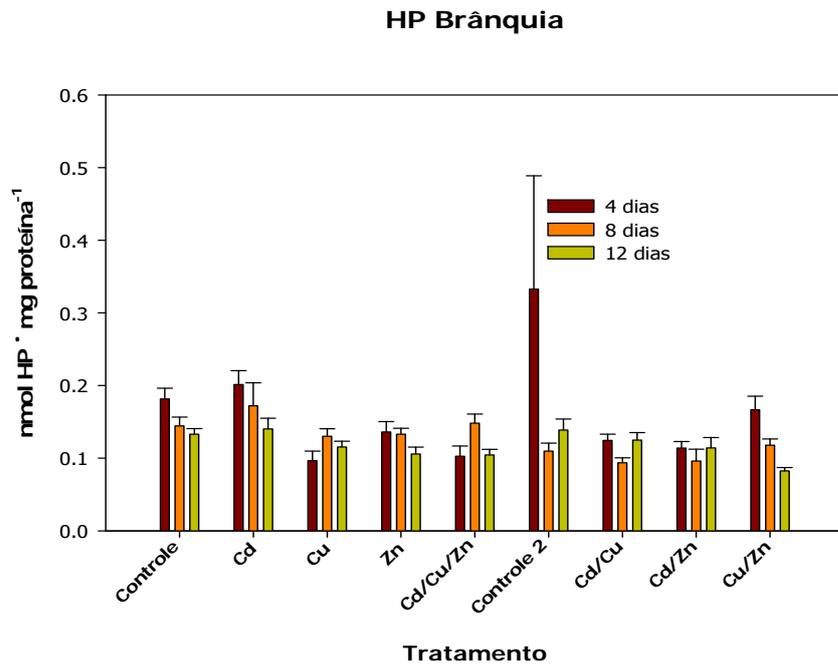


Figura 32: Níveis de hidroperoxidos de lipídios (HP) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

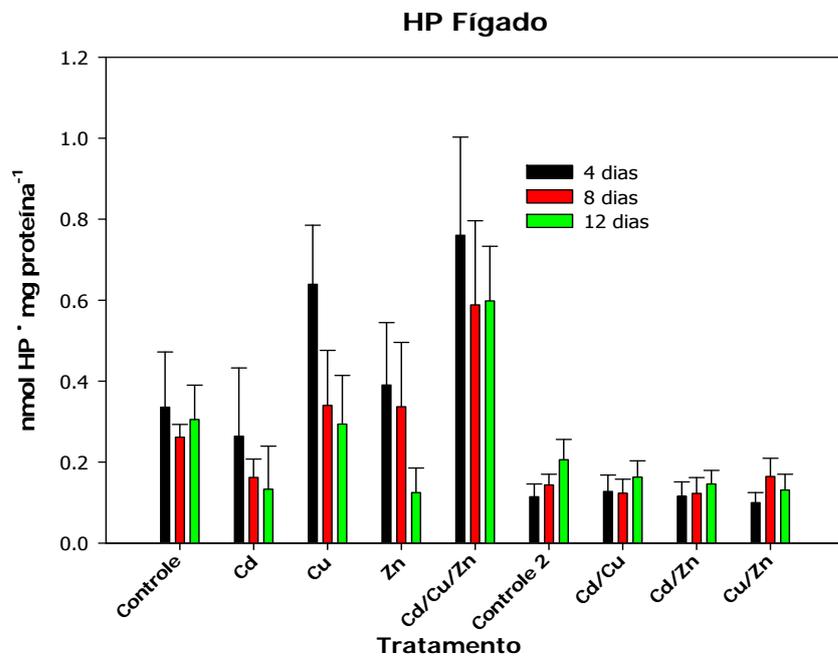


Figura 33: Níveis de hidroperoxidos de lipídios no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

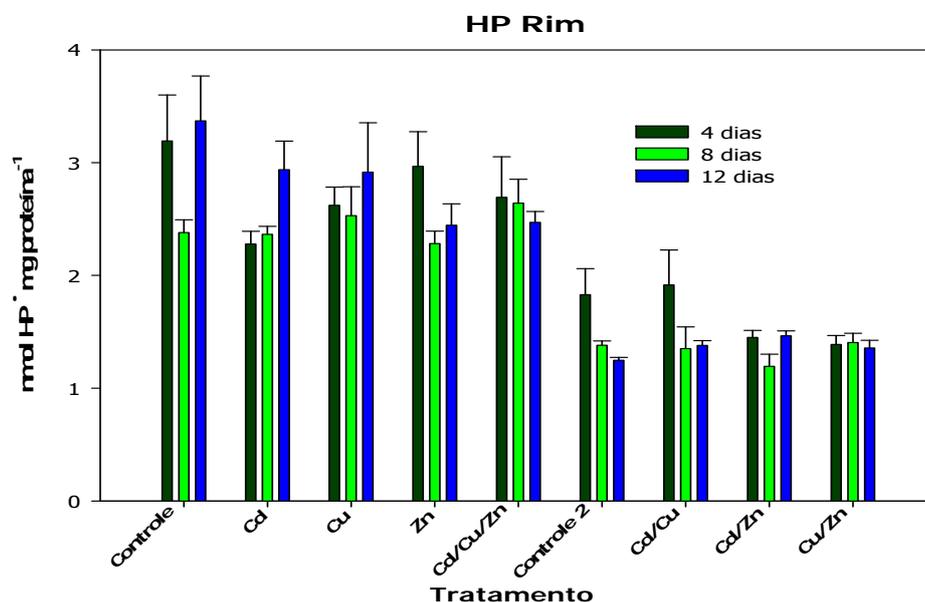


Figura 34 : Níveis de hidroperoxidos de lipídios no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

As análises discriminantes referentes aos mesmos tratamentos em diferentes tempos estão apresentadas nas figuras 35, 36, 37 e 38. Observando-se os dados referentes ao primeiro bioensaio (Figuras 35 e 36), nota-se que somente em 4 dias de exposição houve diferenças entre o controle e o grupo basal. Os níveis de HP na brânquia foram responsáveis por estas diferenças.

Na exposição ao cádmio, constata-se que houve diferença significativa entre os grupos expostos por 4 e 8 dias, em relação aos níveis basais de HP e entre os períodos. A intensidade de aumento nos níveis de HP nas brânquias, a principal variável desta resposta obtida, foi elevada nestes períodos. Em relação à exposição ao cobre, zinco e aos três metais associados, não foram encontradas diferenças significativas na resposta dos níveis de HP entre os períodos analisados.

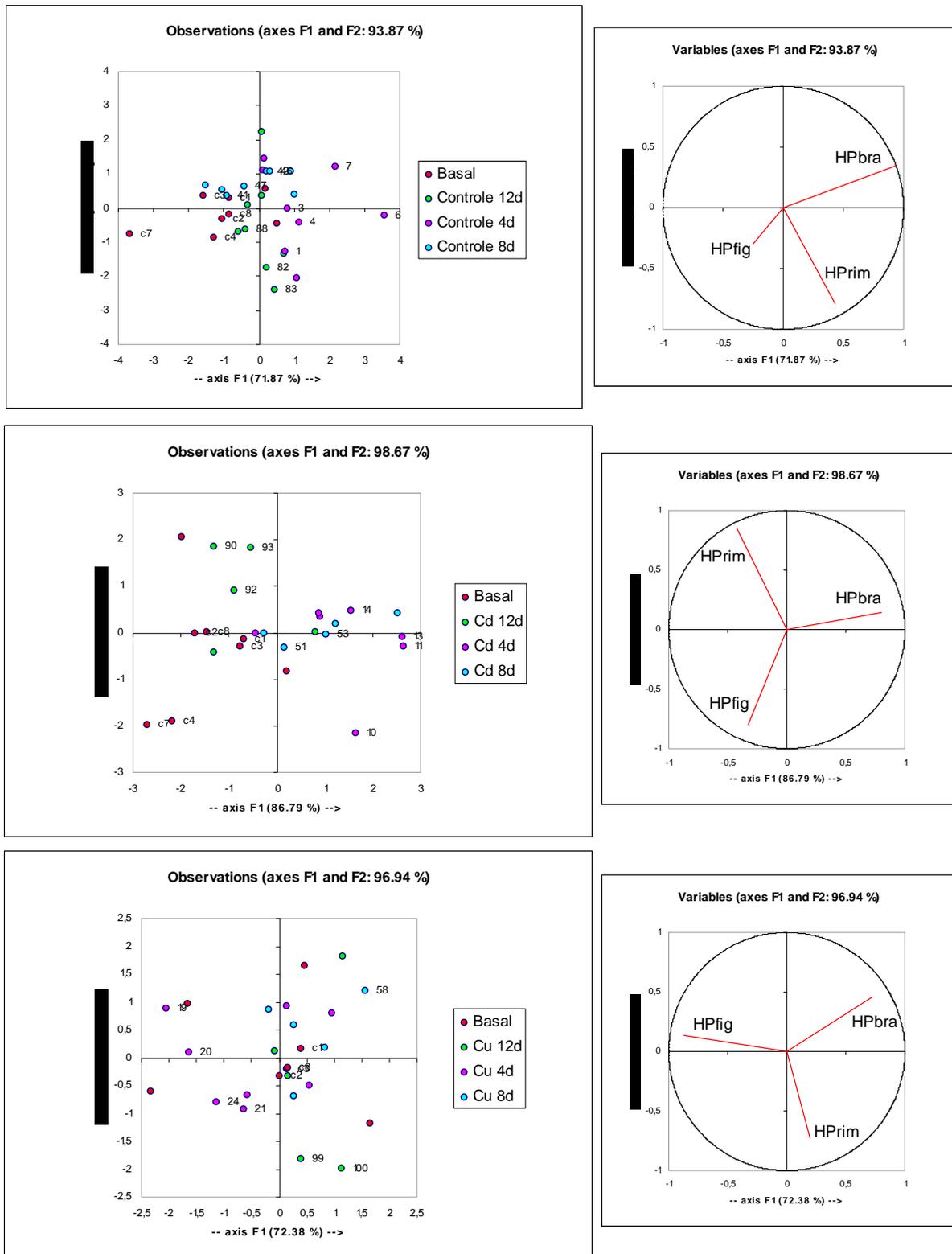


Figura 35: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*.

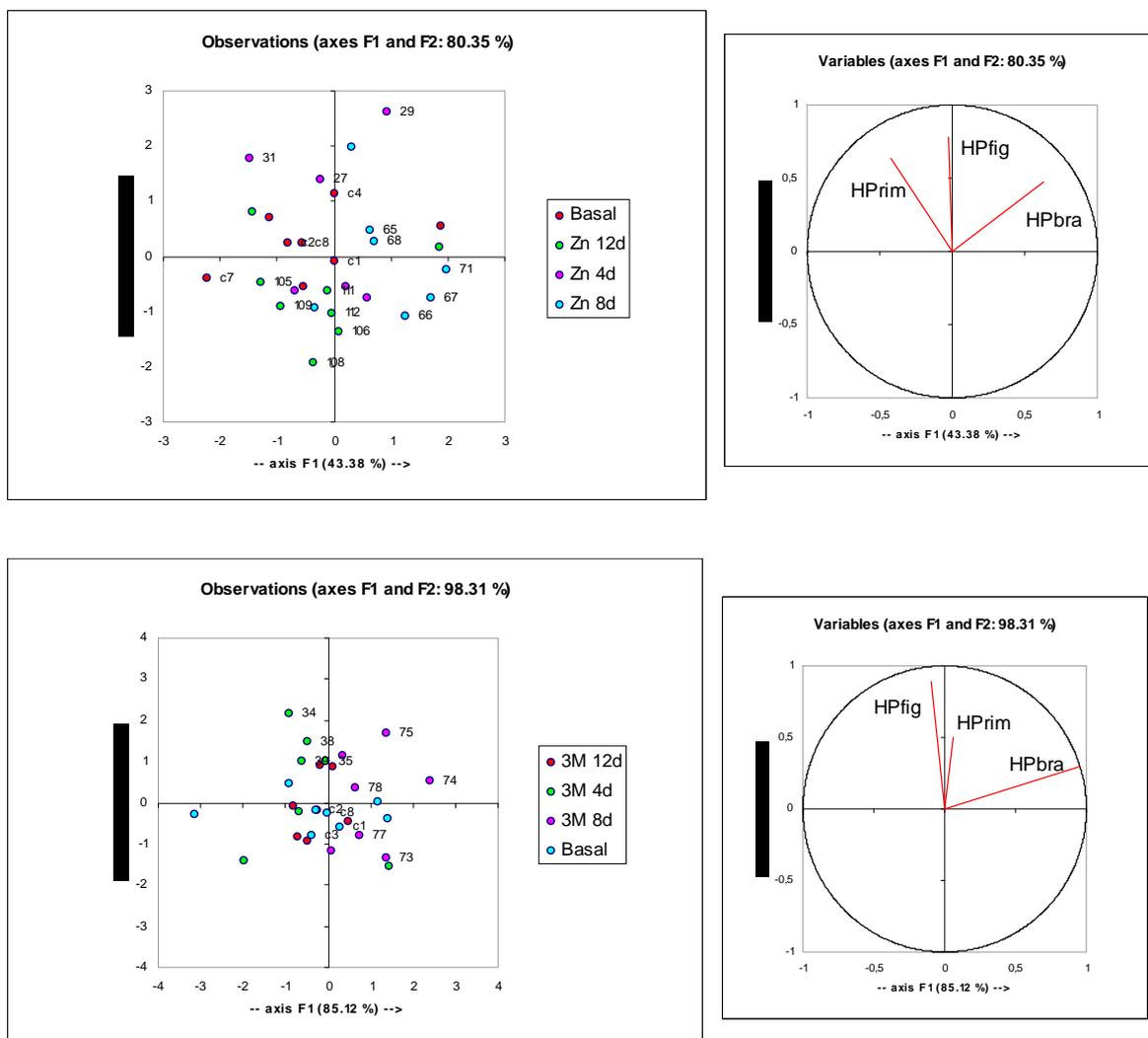


Figura 36: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPprim) de *Oreochromis niloticus*.

Em relação aos experimentos com metais combinados dois à dois (Figuras 37 e 38), observou-se que no período de 4 dias houve diferença entre o controle e o grupo basal. Os níveis de HP no rim foram primordialmente responsáveis por esta diferença. Ocorreu também diferença significativa entre os controles em 12 e 4 dias, sendo que, respectivamente, os níveis de HP no rim foi responsável por esta diferença.

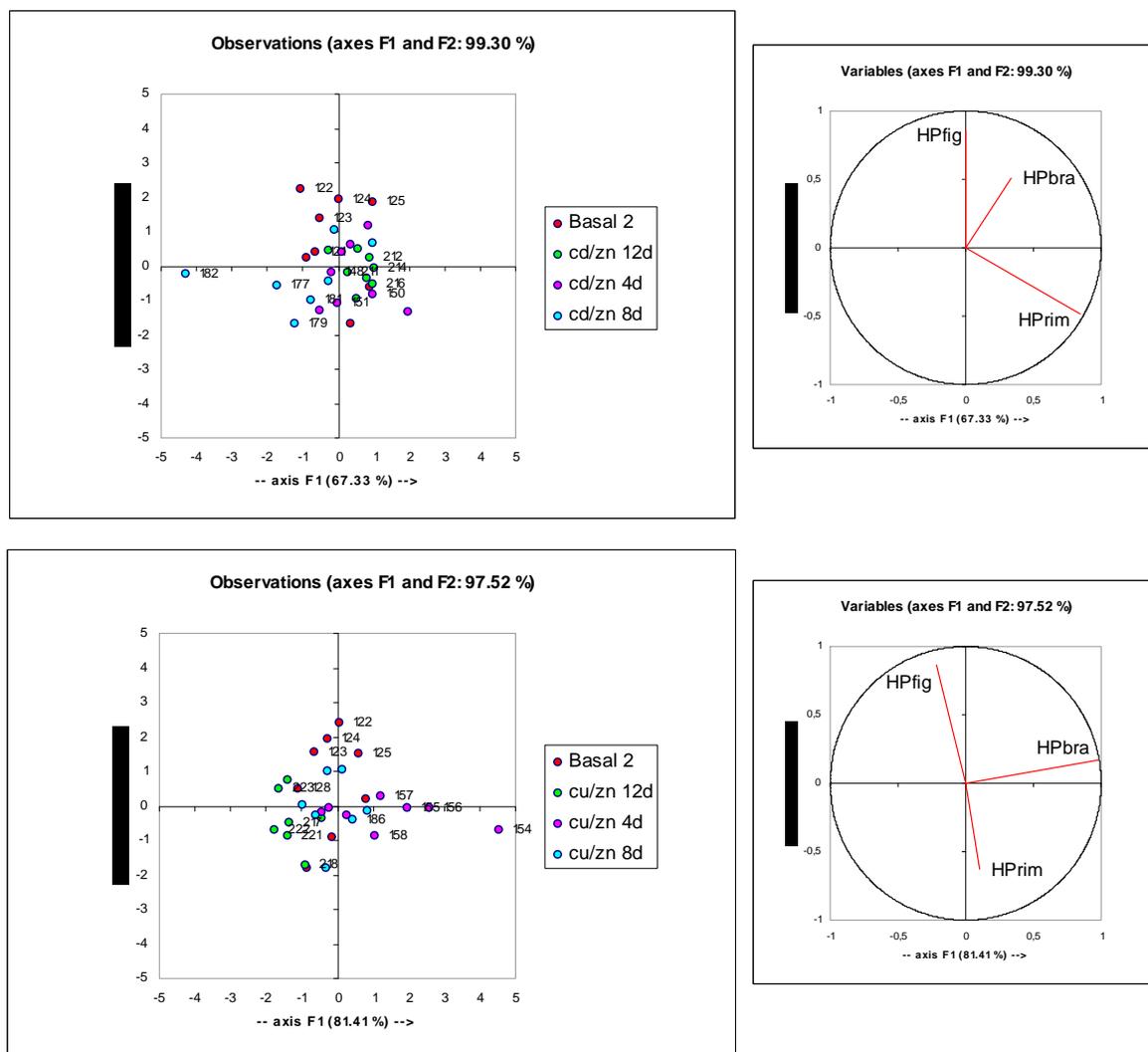


Figura 38: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*.

As figuras 39 e 40 apresentam os resultados das análises discriminantes entre tratamentos para um mesmo período. Em relação ao primeiro bioensaio (Figura 39) em 4 dias de exposição observou-se que em relação ao controle, a exposição aos três metais combinados e ao cobre promoveu diferenças significativas em relação aos níveis de HP. Ocorreu diminuição dos níveis de HP na brânquia, tecido que apresentou a principal variação nas respostas. Observou-se também diferenças entre os grupos expostos ao cádmio e aos três metais combinados, e entre o grupo Cu e o grupo Cd. A variável que mais influência teve nestes resultados foi a HP na brânquia e com menor intensidade, a HP no fígado. No caso das brânquias expostas ao cobre houve diminuição dos níveis de HP e no caso do fígado, aumento. Para o Cd ocorreu o resultado inverso. Para a exposição aos metais em 8 e 12 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Para os metais combinados dois à dois não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em 4 e 8 dias de exposição. Para 12 dias de exposição observou-se que diferenças significativas ocorreram entre os três tratamentos e o grupo controle. As variáveis que contribuíram intensamente para este resultado foram a HP nas brânquias primordialmente e no rim, tendo ocorrido a diminuição da concentração nas brânquias e o aumento da concentração nos rins.

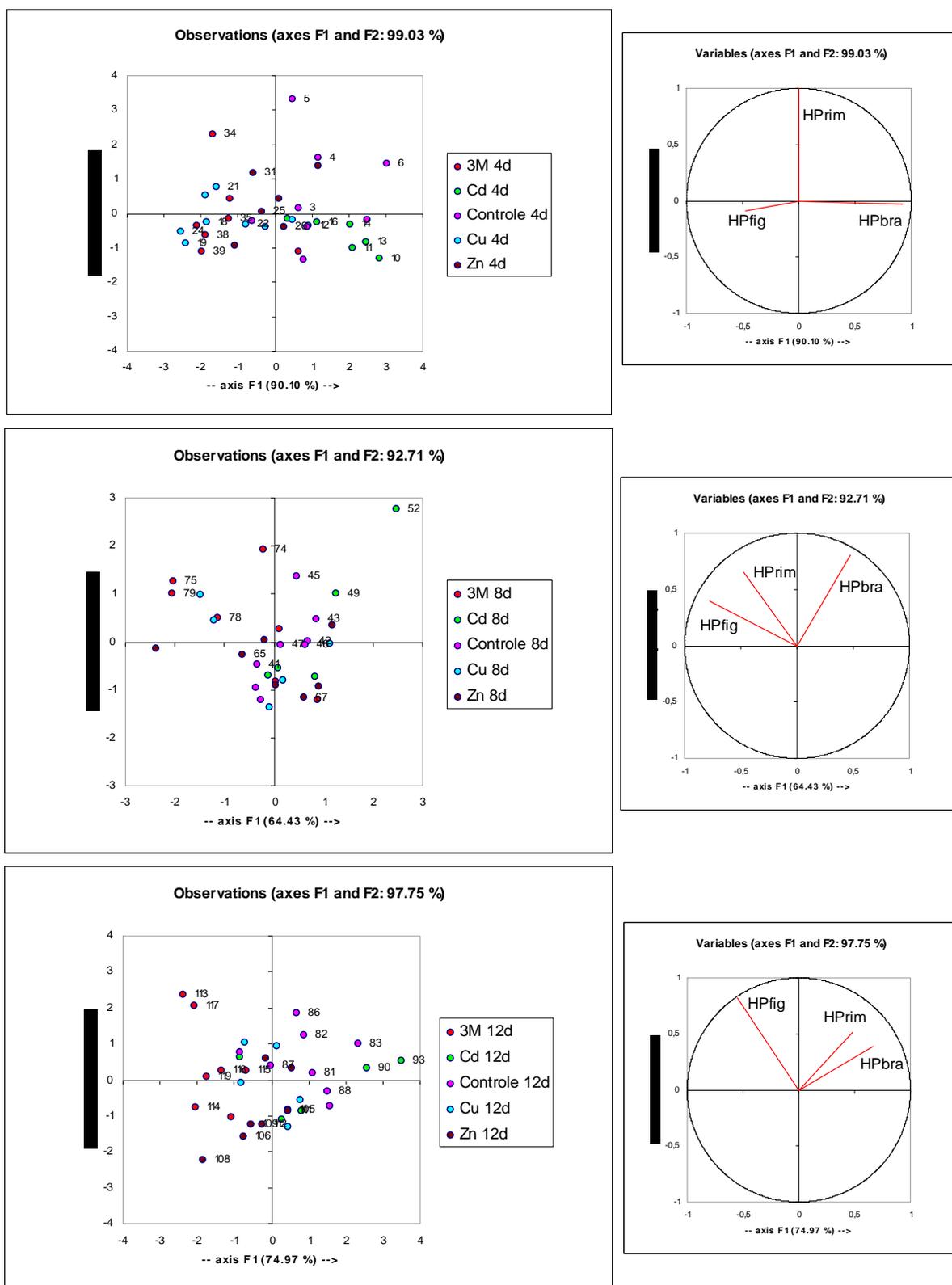


Figura 39: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*.

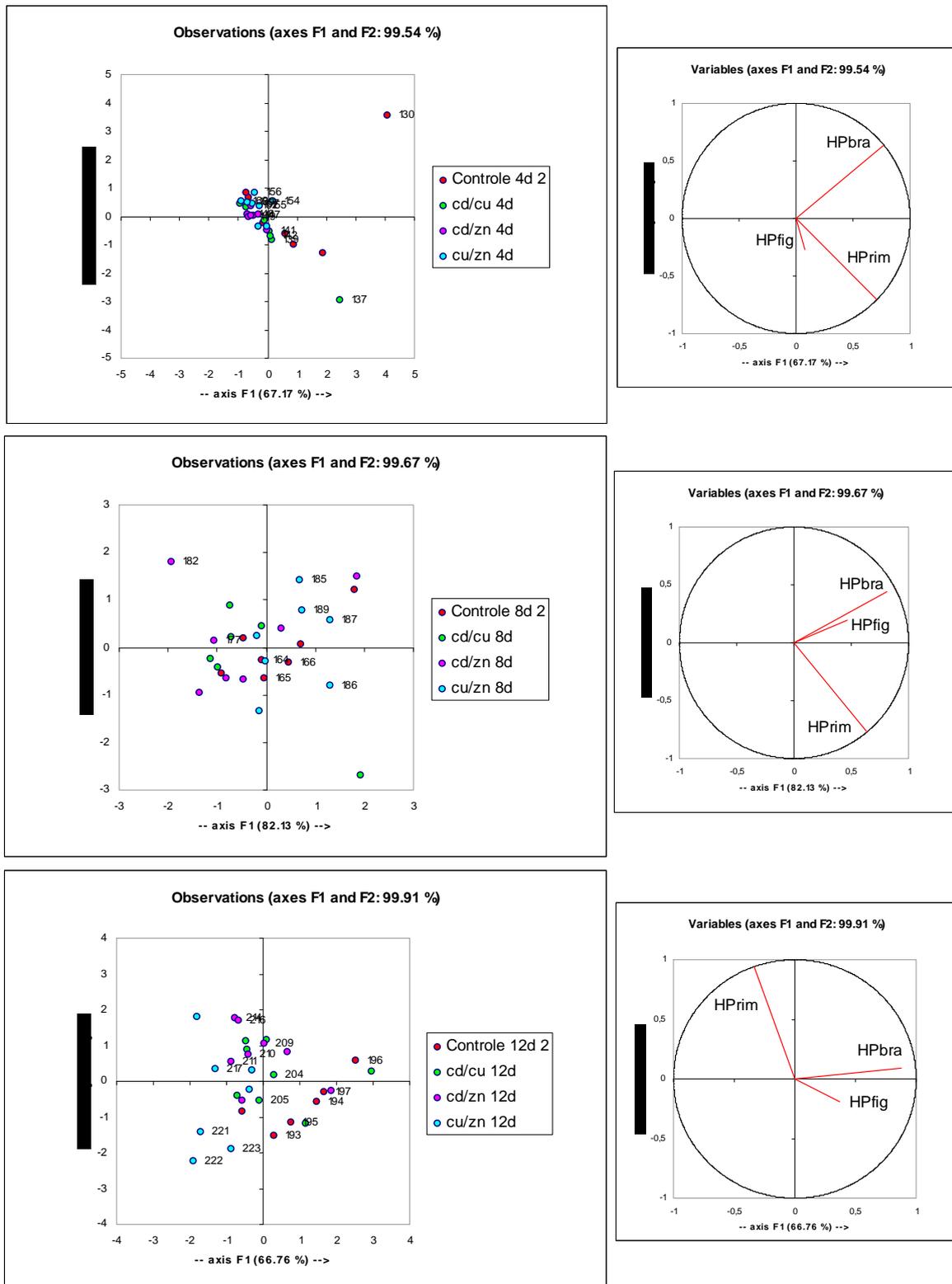


Figura 40: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a peroxidação de lipídios em brânquia, fígado e rim (HPbra, HPfig e HPrim) de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados obtidos para os níveis de glutathione S-transferase (GST) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Padrão de estímulo (preto) ou inibição (vermelho) da atividade da GST em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. (valores expressos em porcentagem)

GST Brânquia	Dias	Tratamento						
		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	8.07	49.19	30.00	45.62	30.99	36.05	1.67
	8	21.20	0.73	4.66	3.44	123.70	98.72	61.47
	12	12.18	26.98	38.71	21.54	22.56	30.28	36.90
Ref. Basal	4	51.84	16.09	15.61	10.18	143.99	19.11	83.15
	8	55.12	28.91	22.02	23.59	102.27	79.69	46.01
	12	21.61	20.85	33.56	14.95	85.67	67.17	51.30
<hr/>								
GST Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	14.55	5.78	4.10	7.74	7.37	24.91	31.36
	8	13.93	32.45	32.72	5.91	48.23	30.56	45.28
	12	5.02	2.17	16.20	8.54	42.27	23.14	34.67
Ref. Basal	4	21.65	3.01	4.55	15.40	14.14	0.11	45.11
	8	13.30	0.78	0.99	19.41	36.33	14.59	32.69
	12	1.02	7.80	21.03	13.80	66.33	28.18	61.90
<hr/>								
GST Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	27.93	16.26	10.80	33.46	5.52	10.05	35.89
	8	3.72	18.23	49.88	48.31	9.41	9.36	23.74
	12	4.89	1.76	17.92	13.33	19.34	2.97	19.48
Ref. Basal	4	23.63	11.26	5.47	29.49	6.83	20.58	43.39
	8	29.59	13.53	9.62	8.47	26.16	38.82	16.49
	12	23.20	19.51	3.59	1.80	5.86	23.46	36.48

Para a GST, em relação ao controle, constatou-se que nas brânquias ocorreu inibição na exposição de *O. niloticus* ao zinco e para os três metais associados, ao longo dos 12 dias. Para o cádmio ocorreu aumento nos níveis da atividade da GST em 4 e 8 dias. Para o cobre, Cd/Zn e Cu/Zn houve aumento na atividade da GST em 8 dias de exposição. Para o grupo Cd/Cu ocorreu inibição

apenas em 12 dias de exposição, sendo que a elevação máxima da atividade ocorreu em 8 dias (123,70%). Em comparação aos níveis basais de GST, ocorreu elevação de sua atividade nos tratamentos Cd, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Para o grupo Zn ocorreu inibição em 12 dias de exposição. E para os grupos Cu e Cd/Cu/Zn constatou-se a elevação da atividade da GST em 8 dias de exposição.

Para o fígado, comparado com o controle, a atividade da GST demonstra que ocorreu inibição da atividade em 4 dias de exposição ao Cd. Para o Cu e Zn, ocorreu inibição da atividade em 12 dias de exposição. Para os três metais ocorreu elevação da atividade da GST em 8 dias. Para o grupo Cd/Cu houve aumento na atividade em 4 dias de exposição, enquanto que para Cd/Zn ocorreu inibição em 8 dias de exposição. Para o grupo Cu/Zn a inibição ocorreu ao longo de todo o experimento. Em relação aos níveis basais da atividade da GST, ocorreu uma inibição nos tratamentos Cd/Cu/Zn, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Na exposição ao cobre e ao zinco ocorreu aumento da atividade da GST em 8 dias de experimento e para o cádmio, ocorreu inibição ao longo dos 12 dias de exposição.

Para o rim, em comparação à atividade apresentada pela GST no controle, ocorreu elevação da atividade em 12 dias para a exposição ao cádmio. Para o cobre houve inibição em 4 dias de exposição apenas. Para os grupos Zn, Cd/Cu/Zn e Cu/Zn ocorreu aumento da atividade da GST em 8 dias. Para o grupo Cd/Zn ocorreu inibição em todos os períodos de exposição. Em comparação com os níveis basais da atividade da GST, constatou-se que ocorreu a sua elevação em 12 dias nos tratamentos Cd e Cu e em 8 dias para Zn. Ocorreu inibição da atividade da GST no rim em 4 dias no tratamento de exposição aos três metais associados. E, por fim, ocorreu inibição ao longo dos 12 dias de exposição para os tratamentos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn.

As Figuras 41, 42 e 43 representam os dados obtidos para as análises da GST nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

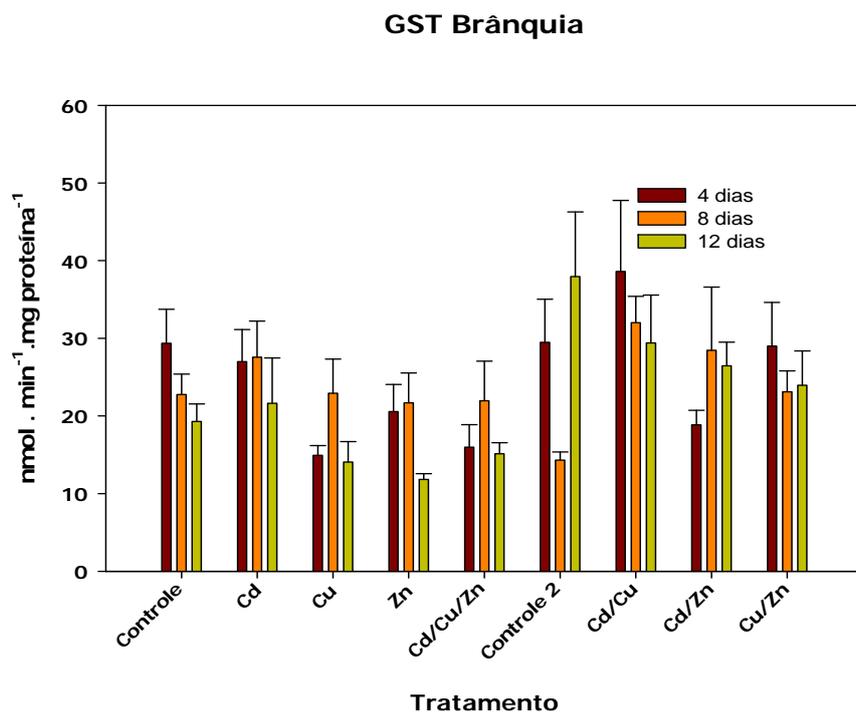


Figura 41: Níveis de glutatona S-transferase (GST) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

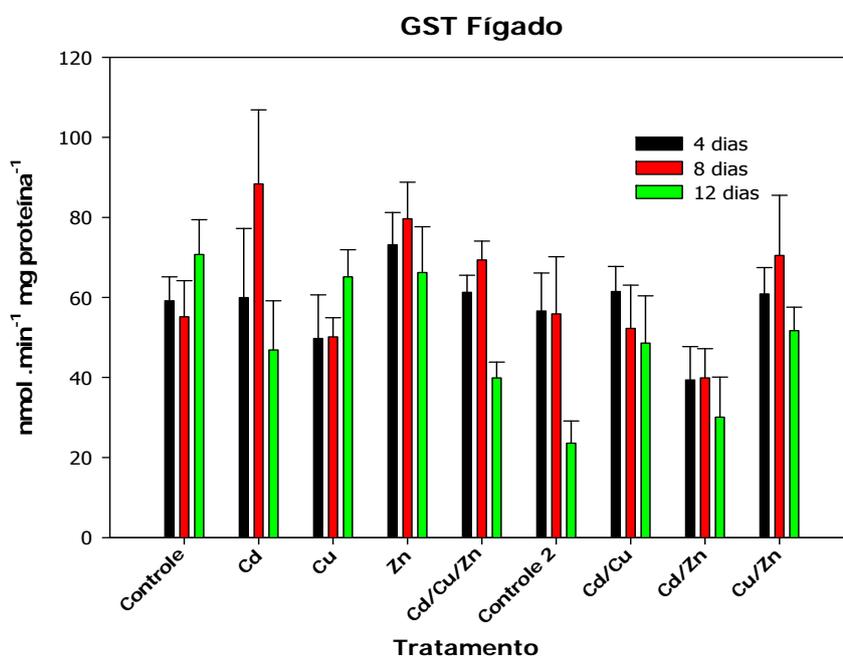


Figura 42: Níveis de glutatona S-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

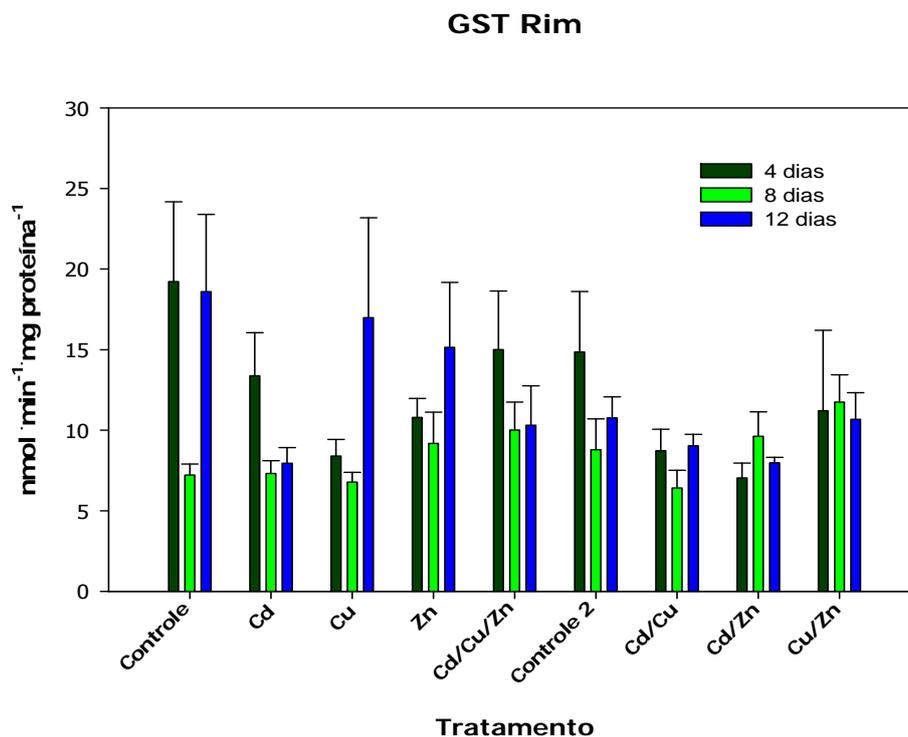


Figura 43 : Níveis de glutatona S-transferase no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

As Figuras 44, 45, 46 e 47 apresentam os gráficos referentes à análise discriminante para os resultados dos tratamentos iguais em tempos diferentes. Assim, para o primeiro bioensaio (Figuras 44 e 45), observando o Controle1, Cd e Cu e Cd/Cu/Zn em relação à GST, constata-se que não houve distinção entre os períodos de exposição em todos os tratamentos, frente aos níveis iniciais (basal1).

Para o grupo exposto ao zinco por 12 dias, ocorreram alterações significativas em relação à atividade basal para esta enzima em *O. niloticus*. Os níveis de GST relacionados às brânquias e ao fígado foram determinantes para esta diferenciação e verificou-se que houve inibição neste período. Ocorreram também diferenças significativas entre os grupos expostos ao zinco por 8 e 12 dias. Além dos níveis de GST no fígado e nas brânquias, os níveis encontrados no rim de *O. niloticus* também influenciaram este comportamento da atividade da GST, pois em 8 dias ocorreu aumento da atividade e em 12 dias ocorreu inibição.

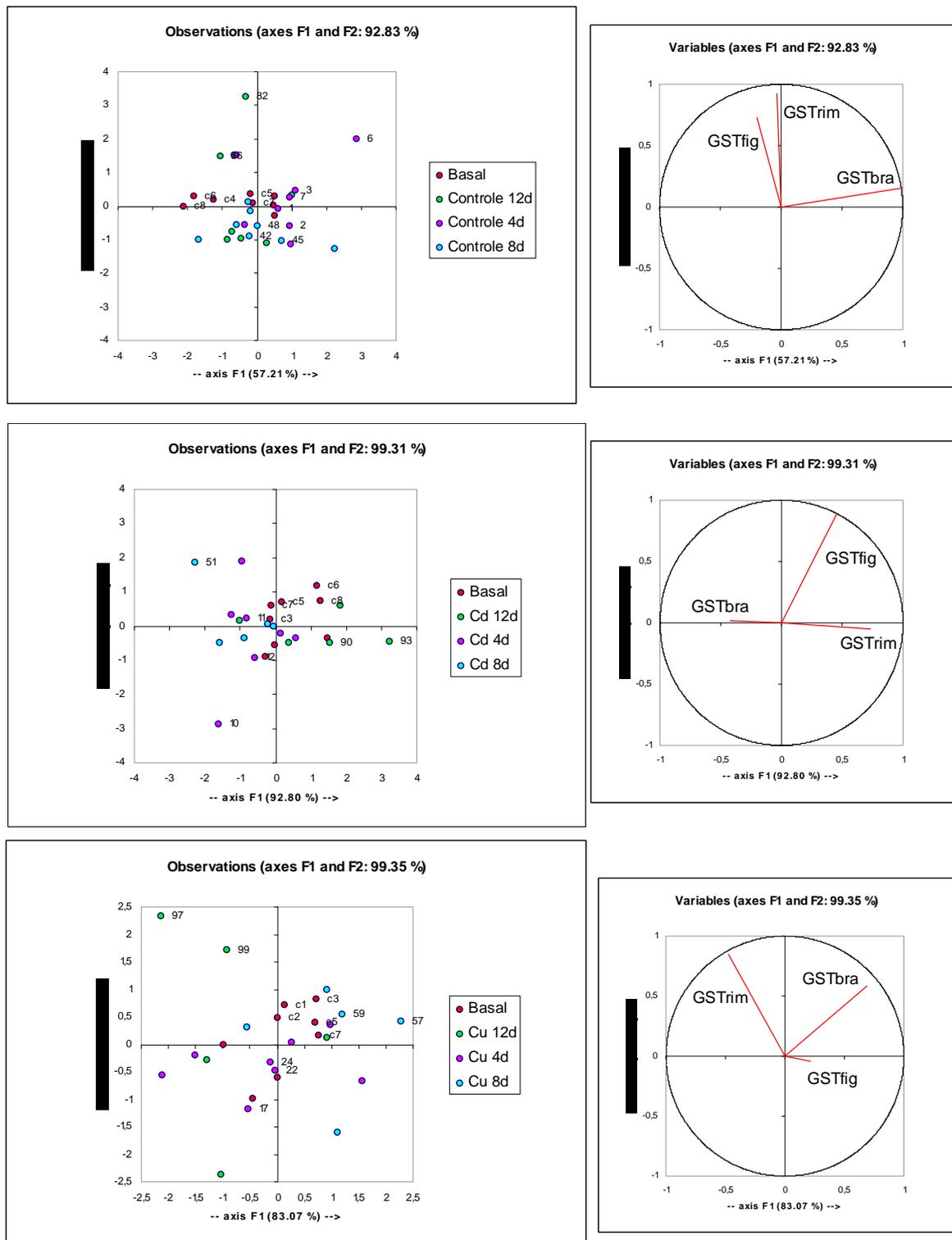


Figura 44: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*.

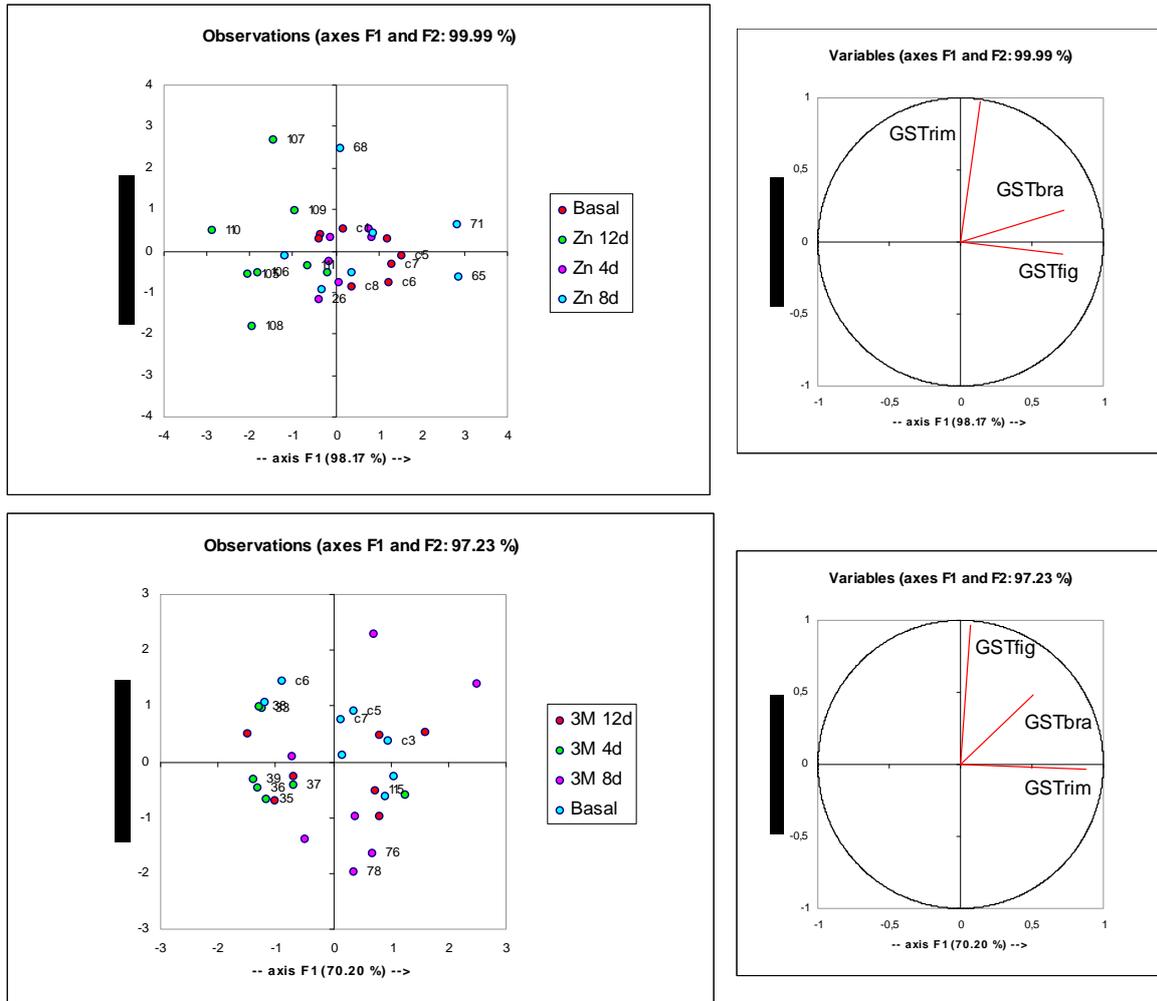


Figura 45: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutationa S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTTrim) de *Oreochromis niloticus*.

Em relação à exposição aos metais, de forma combinada, dois à dois (Figuras 46 e 47), observou-se que no controle, exposto por 12 dias, existiram diferenças em relação aos níveis basais da atividade da GST em *O. niloticus* e com o controle exposto por 8 dias. A atividade da GST na brânquia foi o fator principal da resposta encontrada. Também ocorreram diferenças significativas entre o controle exposto por 8 dias e 4 dias. Neste caso, a GST no fígado também foi um fator de diferenciação, embora com importância menor, frente à GST nos outros dois tecidos. Para os grupos expostos ao cádmio e ao cobre juntos, não houve diferenças ao longo do experimento.

Para o tratamento Cd/Zn observou-se que a exposição por 8 e 12 dias apresentou diferenças significativas em relação aos níveis basais da atividade da GST em *O. niloticus*. O fator principal desta diferenciação refere-se à atividade da GST no rim. No primeiro caso ocorreu inibição da GST e no segundo caso a sua indução.

Para o tratamento com cobre e zinco associados, em relação aos níveis basais de atividade da GST observou-se uma diferença significativa no período de 4 e 12 dias de exposição. A GST na brânquia foi importante para determinar estas diferenças observadas, já que houve intensa inibição da sua atividade no fígado e indução nas brânquias.

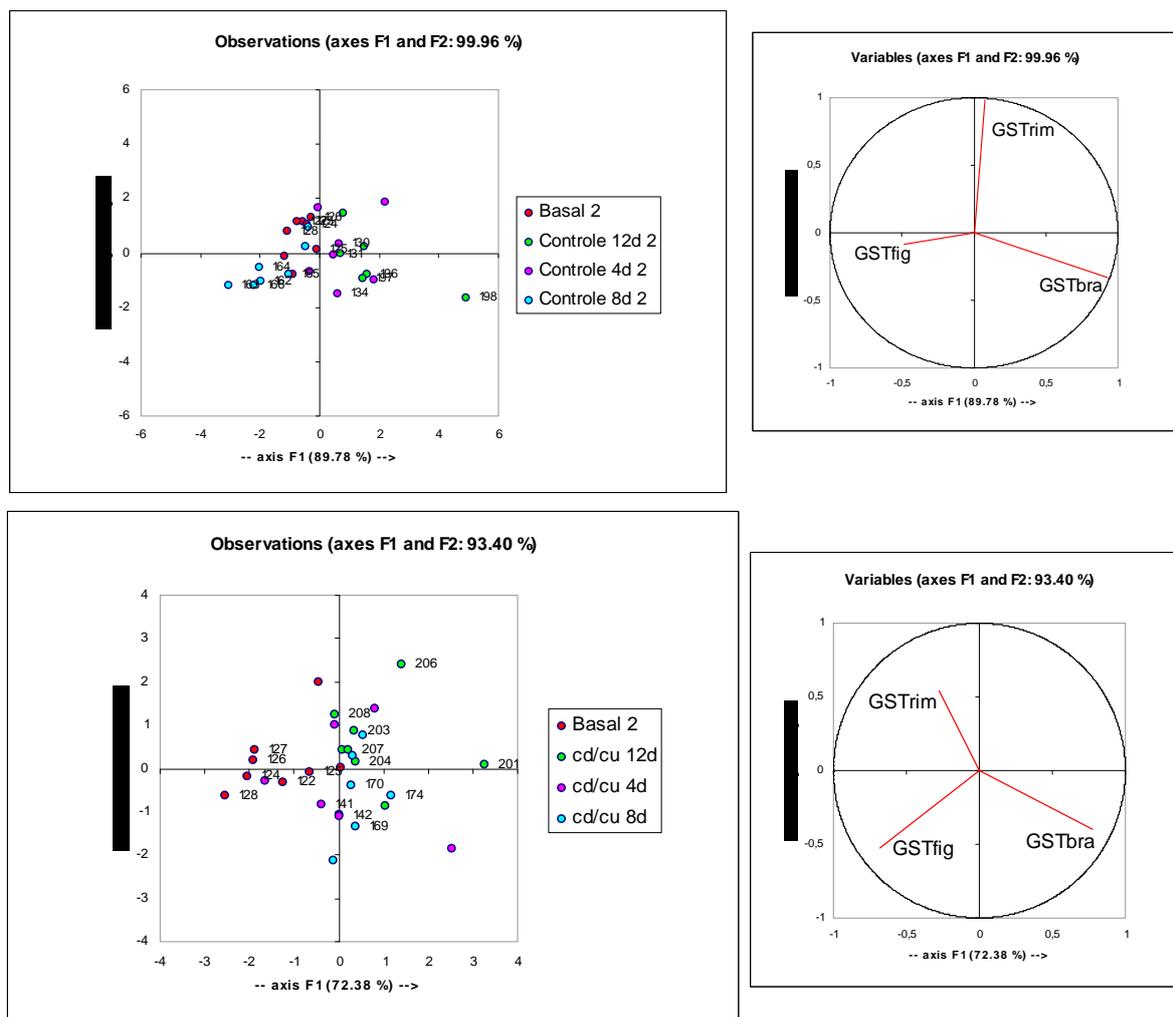


Figura 46: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutationa S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*.

Quanto ao que se observa as diferentes exposições no mesmo período (Figuras 48 e 49), observou-se para o primeiro bioensaio (Figura 48) que há diferenças significativas para os grupos expostos ao cobre e aos metais Cd/Cu/Zn em relação ao controle, resultado da atividade da GST nas brânquias de *O. niloticus*, principalmente. Não se observou diferença significativa entre os grupos expostos por 8 dias e 12 dias. Ocorreu inibição da atividade da GST neste tratamento.

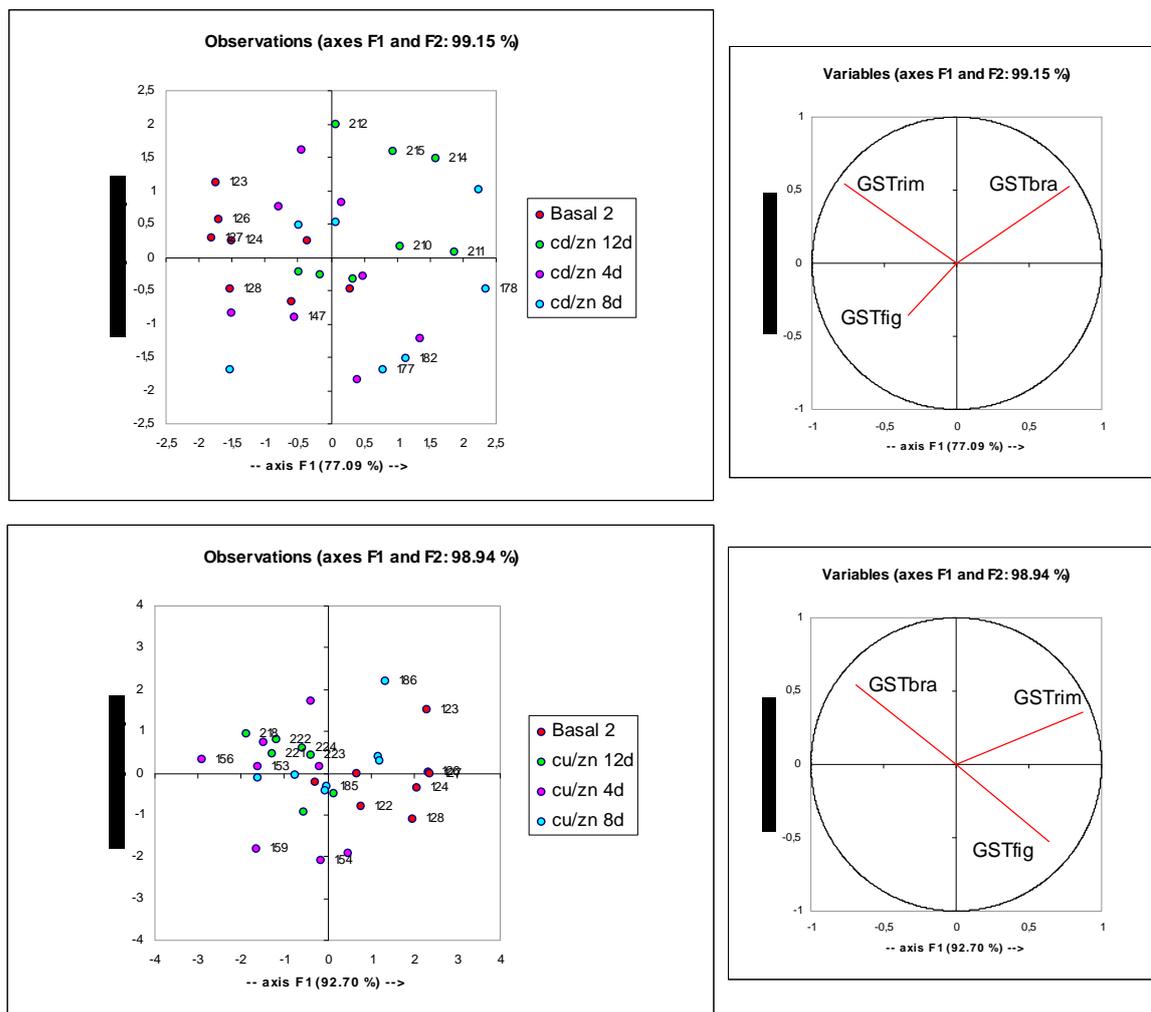


Figura 47: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutiona S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*.

Para o segundo bioensaio (Figura 49), para o período de 4 e 12 dias não houve diferenças significativas entre os tratamentos, inclusive controle. Para exposição por 8 dias, o grupo Cd/Cu apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (ocorreu aumento da atividade da GST). As atividades da GST nas brânquias e no fígado foram, respectivamente, determinantes para estas alterações observadas.

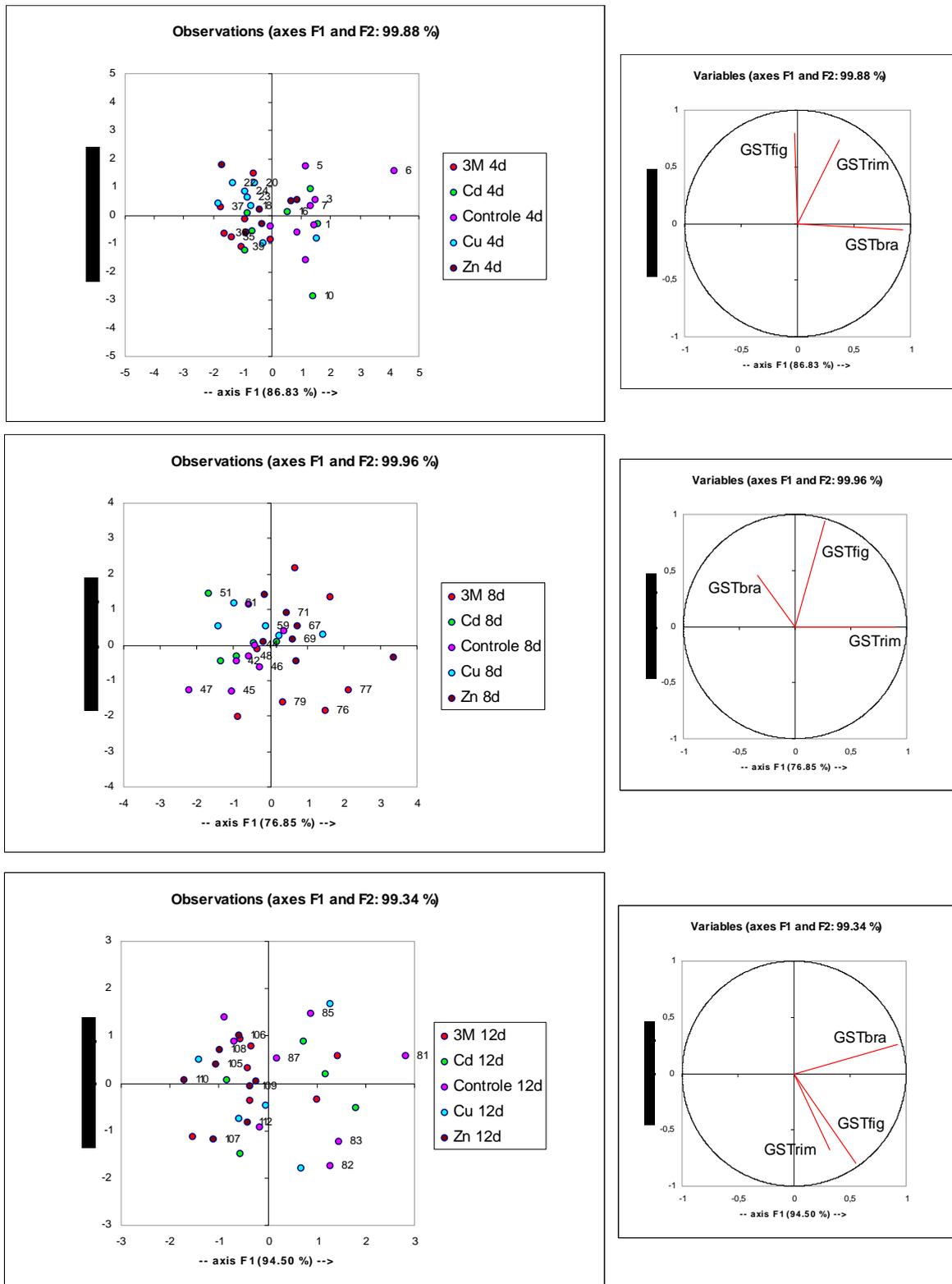


Figura 48: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTTrim) de *Oreochromis niloticus*.

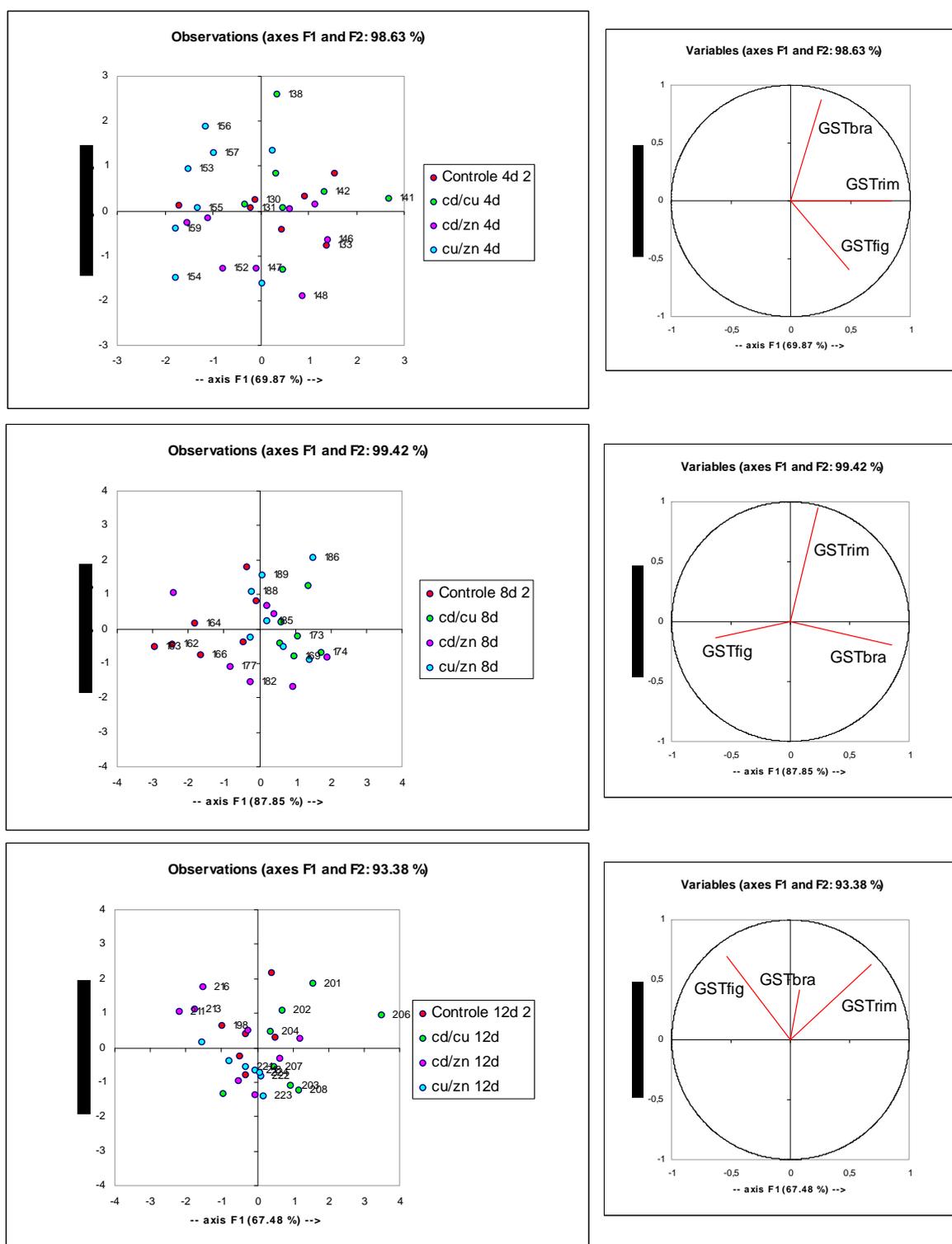


Figura 49: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a glutatona S-transferase em brânquia, fígado e rim (GSTbra, GSTfig e GSTrim) de *Oreochromis niloticus*.

Os resultados obtidos para os níveis de metalotionéina (MT) em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Padrão de elevação ou diminuição da concentração de MT em brânquias, fígado e rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. (Valores expressos em porcentagem)

MT Brânquia	Dias	Tratamento						
		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	9,66	22,78	5,65	46,08	7,89	8,03	18,71
	8	24,42	71,27	23,27	61,10	9,25	18,86	57,77
	12	1,84	37,40	29,56	63,40	6,83	24,95	24,31
Ref. Basal	4	24,69	6,57	30,21	25,59	11,10	10,99	33,03
	8	54,38	112,51	52,95	99,89	39,84	34,55	13,13
	12	60,44	1,37	104,12	157,44	8,19	26,05	25,42
MT Fígado		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	10,57	43,64	15,73	11,74	39,72	25,26	12,11
	8	71,22	34,55	81,48	31,15	42,95	7,90	5,42
	12	46,45	16,57	10,93	49,69	12,75	39,14	7,60
Ref. Basal	4	2,56	35,36	32,72	1,22	72,47	54,62	8,49
	8	43,75	12,96	52,36	10,11	4,36	68,49	73,03
	12	83,08	4,29	11,35	37,11	17,21	86,91	44,54
MT Rim		Cd	Cu	Zn	Cd/Cu/Zn	Cd/Cu	Cd/Zn	Cu/Zn
Ref. Controle	4	20,78	21,61	23,00	7,94	5,31	26,50	36,15
	8	29,90	64,31	106,64	12,78	0,72	37,24	3,67
	12	33,92	30,79	22,58	25,56	46,16	45,28	60,55
Ref. Basal	4	29,73	28,37	101,42	76,76	11,44	13,50	24,85
	8	58,35	100,30	151,90	37,48	35,17	11,66	33,27
	12	4,75	0,23	11,61	7,30	47,99	47,13	61,88

Observando-se os dados referentes às concentrações de MT nas brânquias de *O. niloticus*, em comparação ao controle, constata-se que ocorreu elevação em 8 e 12 dias para os tratamentos Cd, Zn e Cd/Cu/Zn. Para a exposição ao cobre e ao cobre e zinco associados, ocorreu elevação da concentração de MT apenas em

8 dias de exposição. No tratamento como cádmio e cobre juntos e cádmio e zinco juntos, ocorreu diminuição da concentração da MT em 12 dias apenas. Em relação aos níveis basais de MT, ocorreu aumento ao longo do experimento com exposição ao cádmio e ao zinco. O inverso ocorreu com a exposição ao cádmio e cobre juntos, cádmio e zinco juntos e cobre e zinco juntos. Para o tratamento ao cobre, ocorreu pequena inibição em 12 dias. E para a exposição aos três metais combinados ocorreu inibição apenas em 4 dias de exposição.

Em relação ao fígado, frente às concentrações encontradas no controle, ocorreu elevação da concentração de MT em 8 e 12 dias no grupo exposto ao cádmio. Para o grupo exposto ao cobre e aos três metais combinados, esta elevação ocorreu em 8 dias. Para o grupo Zn, ocorreu diminuição da concentração de MT em 4 e 8 dias. Para a exposição ao cádmio e cobre associados ocorreu aumento em 4 dias e para o grupo exposto ao cádmio e zinco, em 4 e 12 dias. Para o grupo Cu/Zn a elevação de concentração de MT ocorreu em 12 dias. Em relação ao grupo basal ocorreu aumento da concentração de MT ao longo dos 12 dias nos grupos Cd, Zn, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Para o cádmio, ocorreu inibição em 4 dias e para o grupos exposto aos três metais em conjunto, em 12 dias.

Comparando os valores obtidos para o rim, em relação ao controle constatou-se que ocorreu aumento na concentração da MT em 8 dias nos tratamentos CD, Cu, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn. Nos tratamentos Zn e Cd/Cu/Zn ocorreu inibição da concentração de MT em 12 dias. Com referência ao grupo basal ocorreu aumento na concentração de MT em 4 e 8 dias para os grupos Cd e Cu. Para o zinco e os três metais associados ocorreu aumento da concentração de MT por todo o experimento. Para a exposição ao cádmio e cobre associados ocorreu aumento da concentração de MT em 4 dias e para os tratamentos Cd/Zn e Cu/Zn ocorreu inibição ao longo de todo o experimento.

As Figuras 50, 51 e 52 representam os dados obtidos para as análises da MT nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus* exposta aos metais Cd, Cu e Zn e suas associações.

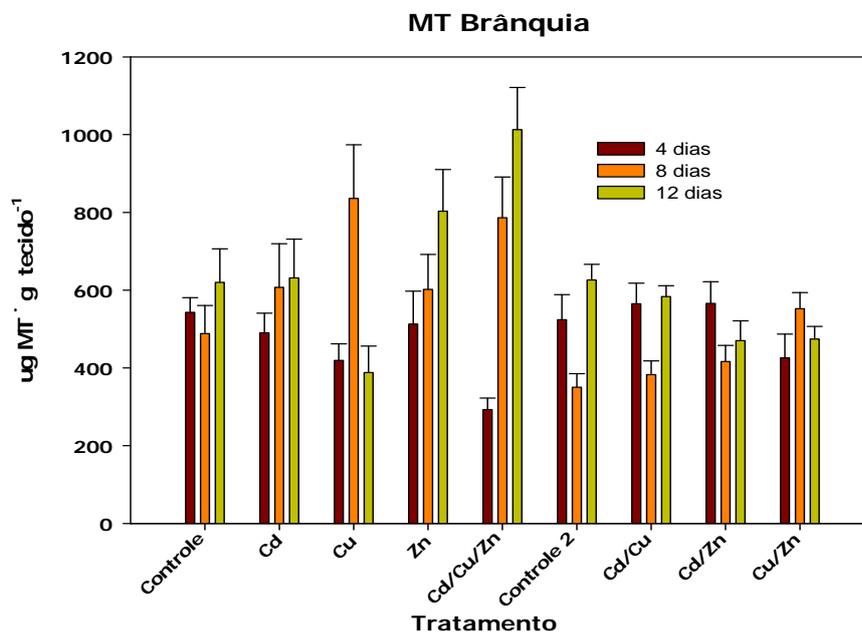


Figura 50: Níveis de metalotioneína (MT) em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

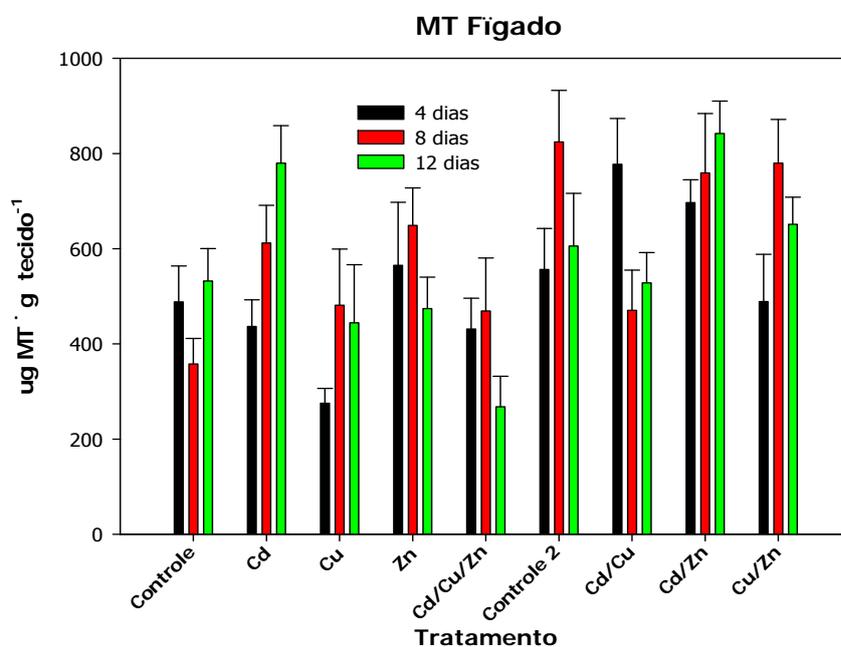


Figura 51: Níveis de metalotioneína no fígado de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

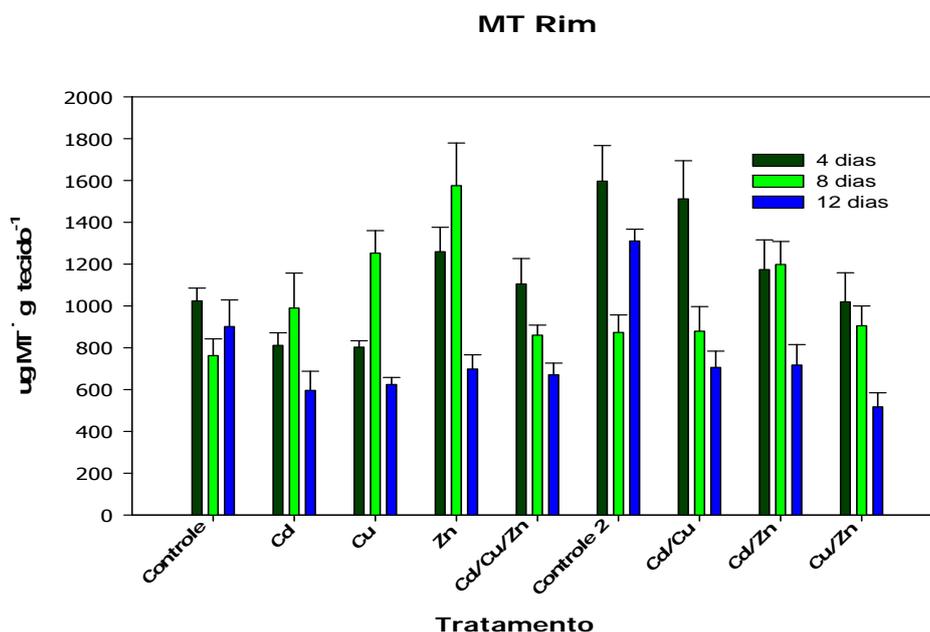


Figura 52 : Níveis de metalotioneína no rim de *Oreochromis niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações. Valores expressos como média \pm SEM.

Os resultados da análise discriminante para os peixes expostos a períodos diferentes de um mesmo tratamento estão representados nas Figuras 53, 54, 55 e 56.

Para o primeiro bioensaio (Figuras 53 e 54), em relação ao controle não ocorreram alterações significativas. Em relação à exposição ao cádmio, ocorreu diferença significativa entre os grupos expostos por 8 e 12 dias, em relação aos níveis basais de MT para *O. niloticus* utilizada no experimento. Ocorreu também diferença entre o grupo exposto ao cádmio em 4 e 12 dias. As análises referentes aos três tecidos tiveram influência nestas diferenças, com participação primordial da concentração de MT de brânquia e fígado. Em todos estes casos verifica-se aumento na concentração da MT nestes órgãos ao longo dos 12 dias de exposição.

Em relação ao cobre, ocorreu uma diferenciação significativa entre as respostas obtidas entre todos os períodos, em relação aos níveis basais. As principais variáveis que contribuíram para este resultado foram a concentração de MT no rim e na brânquia. Neste tratamento, o fato de diferenciação foi a diminuição significativa da concentração de MT em 12 dias de exposição.

Para o zinco, o grupo exposto por 8 dias apresentou diferenças significativas em relação aos níveis basais para a MT em *O. niloticus*. A concentração de MT no rim foi o fator principal que determinou esta diferença. Neste caso, embora tenha ocorrido aumento na concentração da concentração de MT, ela foi significativamente menor no rim, em 12 dias de exposição.

Em relação aos três metais combinados, todos os períodos de exposição apresentaram diferenças significativas em relação aos níveis basais da MT para *O. niloticus*. Os resultados da concentração de MT no rim corroborou para o padrão observado.

Para o segundo bioensaio (Figuras 55 e 56) observou-se que o controle em 8 dias de experimento apresentou alterações significativas em relação ao grupo basal e em relação aos demais períodos de exposição. Os níveis de MT no fígado foi o fator que determinou esta diferença.

Para a exposição ao cádmio e cobre combinados, o grupo basal diferenciou-se dos grupos expostos por 4 e 12 dias. A concentração de MT no rim e no fígado foram os fatores principais para esta distinção.

Em relação à exposição ao cádmio e zinco combinados, houve diferença significativa dos grupos expostos por 8 e 12 dias em relação ao grupo basal. O fator primordial de diferenciação foi a MT no fígado. Já neste caso, o aumento na concentração da MT foi determinante para diferenciar este grupo.

Para a exposição ao cobre e zinco combinados, em 8 e 12 dias de exposição, ocorreu diferença significativa em relação ao grupo basal. A principal variável que determinou a diferenciação destes grupos foi a MT no rim. A diminuição da concentração da MT neste tecido foi crucial para esta diferenciação.

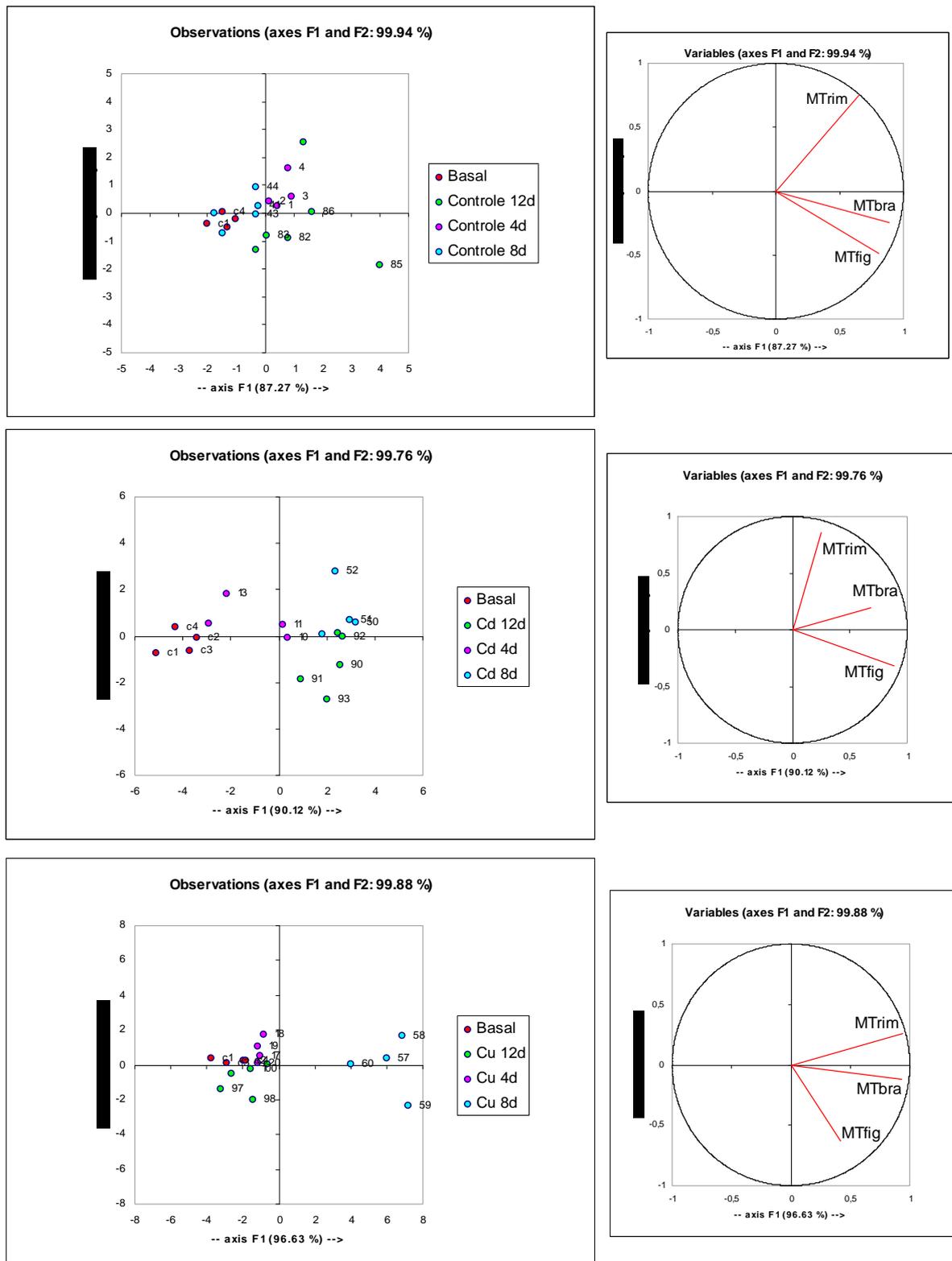


Figura 53: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle1, Cd e Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

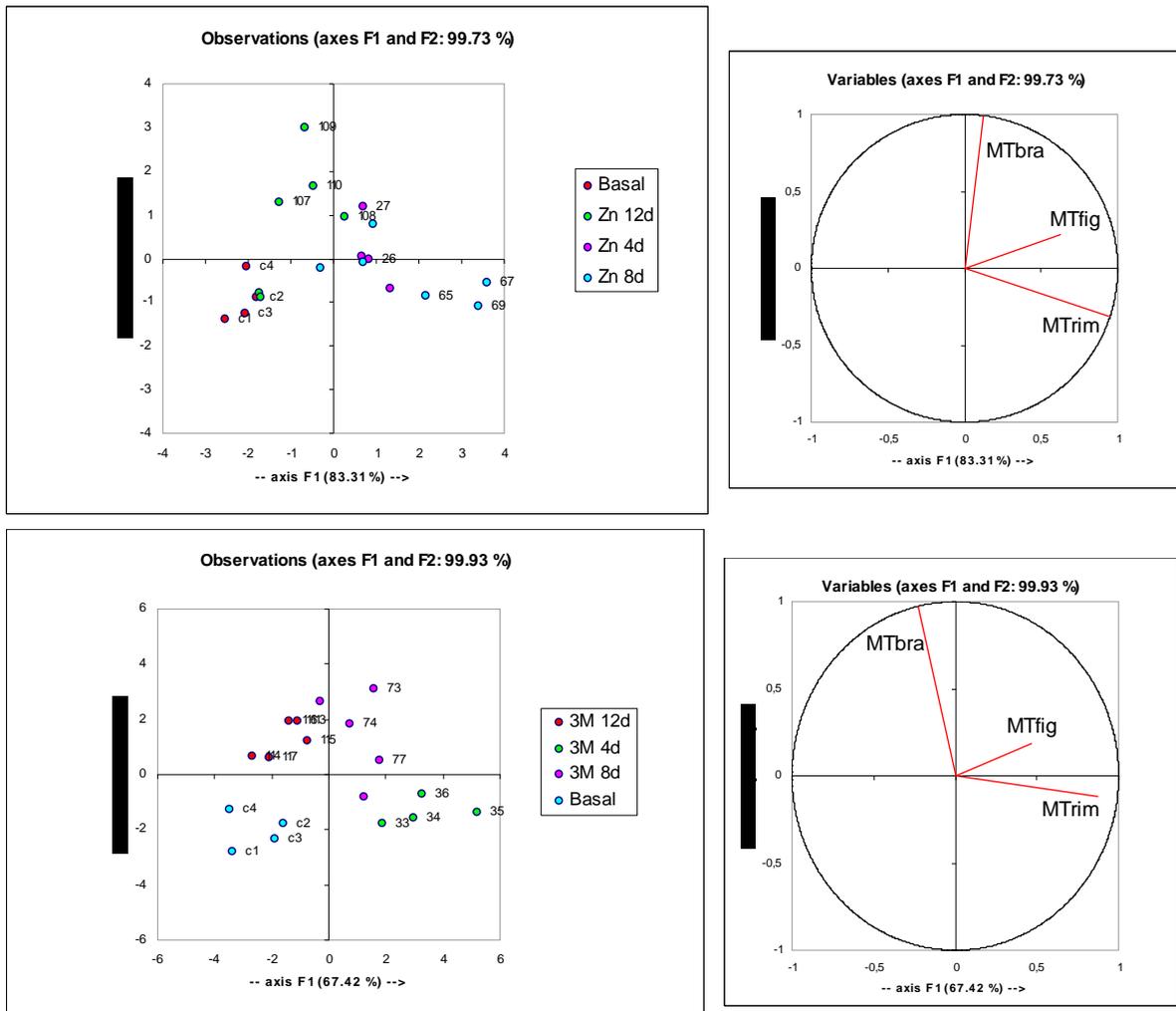


Figura 54: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Zn e Cd/Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquias, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

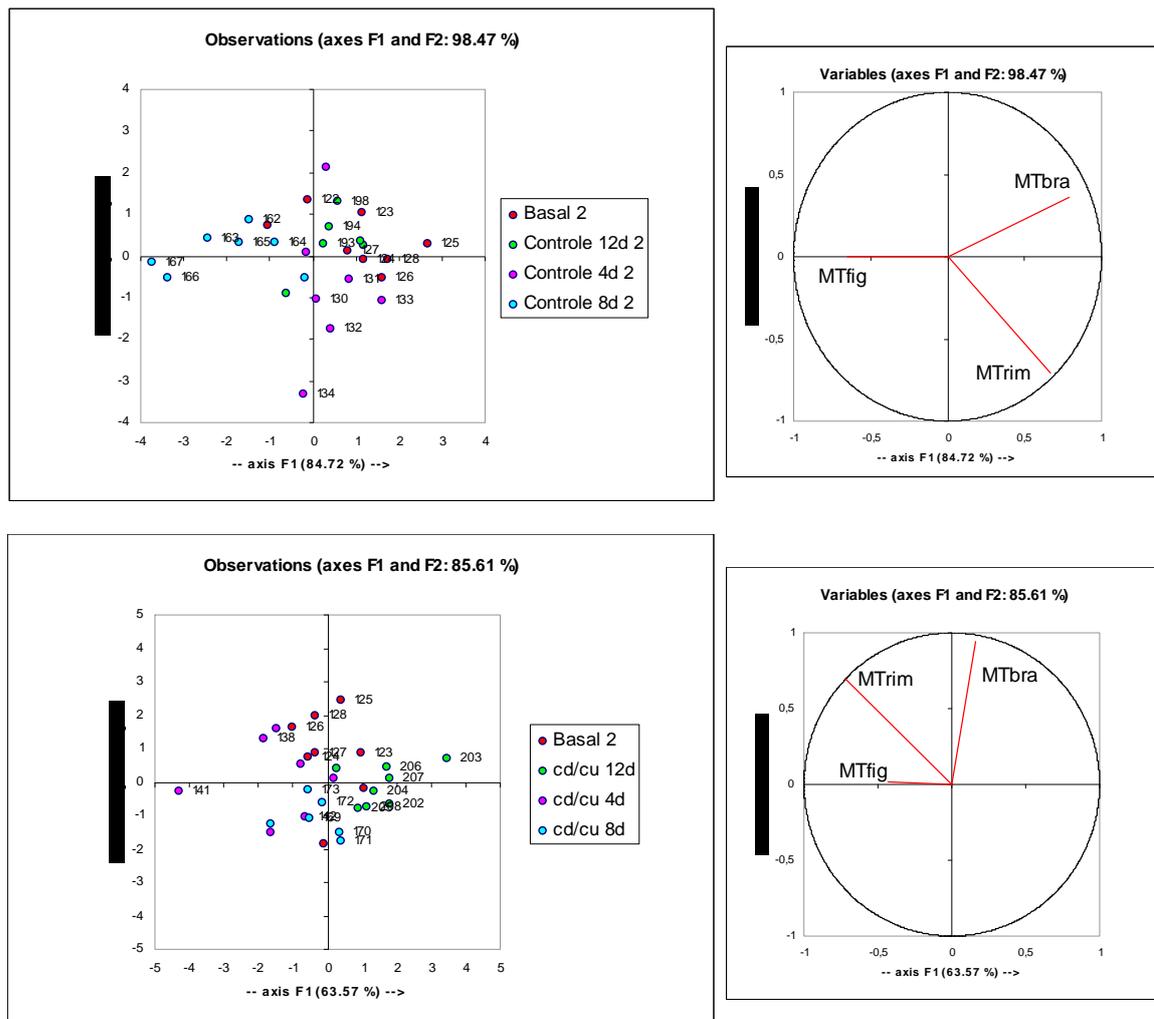


Figura 55: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Controle2, Cd/Cu) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

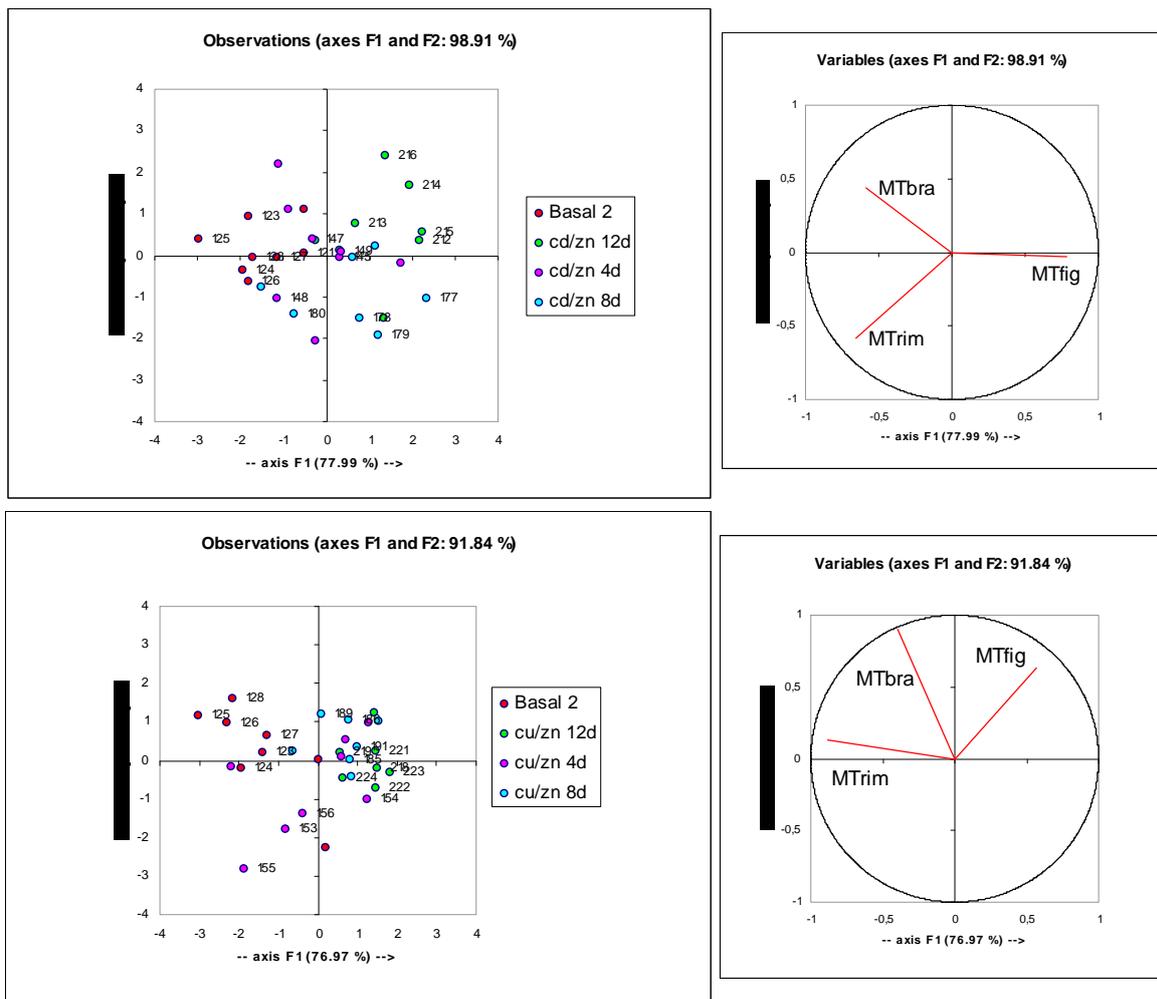


Figura 56: Distribuição no plano discriminante dos mesmos tratamentos (Cd/Zn e Cu/Zn) ao longo de 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

Em relação aos tratamentos comparados entre si em um mesmo período, as análises discriminantes estão apresentadas nas Figuras 57 e 58. Em relação ao primeiro bioensaio (Figura 57) observou-se que em 4 dias de exposição, o grupo exposto ao zinco distinguiu-se significativamente de todos os demais grupos, inclusive do controle. A concentração de MT no rim e fígado foi determinante para esta condição, sendo que ocorreu um aumento significativo da sua concentração.

Em 8 dias de exposição aos metais, constatou-se que houve diferenciação entre os grupos expostos aos três metais combinados, ao zinco e ao cobre e o controle. A concentração de MT na brânquia foi o fator principal para esta observação. Principalmente na brânquia ocorreu o aumento da concentração da MT.

Em 12 dias de exposição não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, incluindo o controle.

Para o segundo bioensaio (Figura 58), os resultados mostraram que em 4 dias de exposição só ocorreu a diferenciação significativa para o controle, do grupo Cu/Zn. Isto se deve principalmente pelas respostas referentes às concentrações da MT no rim, mas também na brânquia, em menor intensidade. O mesmo grupo acima apresentou diferenças significativas também em relação ao grupo Cd/Cu. Os resultados obtidos em todos os tecidos analisados contribuíram para esta diferença.

Em 8 dias de exposição aos metais, apenas o grupo Cu/Zn teve diferença significativa em relação aos demais grupos, inclusive o controle. A concentração da MT na brânquia foi a principal variável que determinou esta diferença, seguida da MT no rim. Em ambos os tecidos, ocorreu aumento na concentração da MT. A diminuição da concentração da MT no fígado teve importância menor nestes resultados.

Após 12 dias de exposição aos metais, todos os grupos se diferenciaram significativamente do grupo controle, sendo que o grupo Cu/Zn, apresentou a maior diferença. Os principais fatores que determinaram estas alterações foram a MT no rim e da brânquia (queda na concentração), seguida da MT do fígado (aumento da concentração).

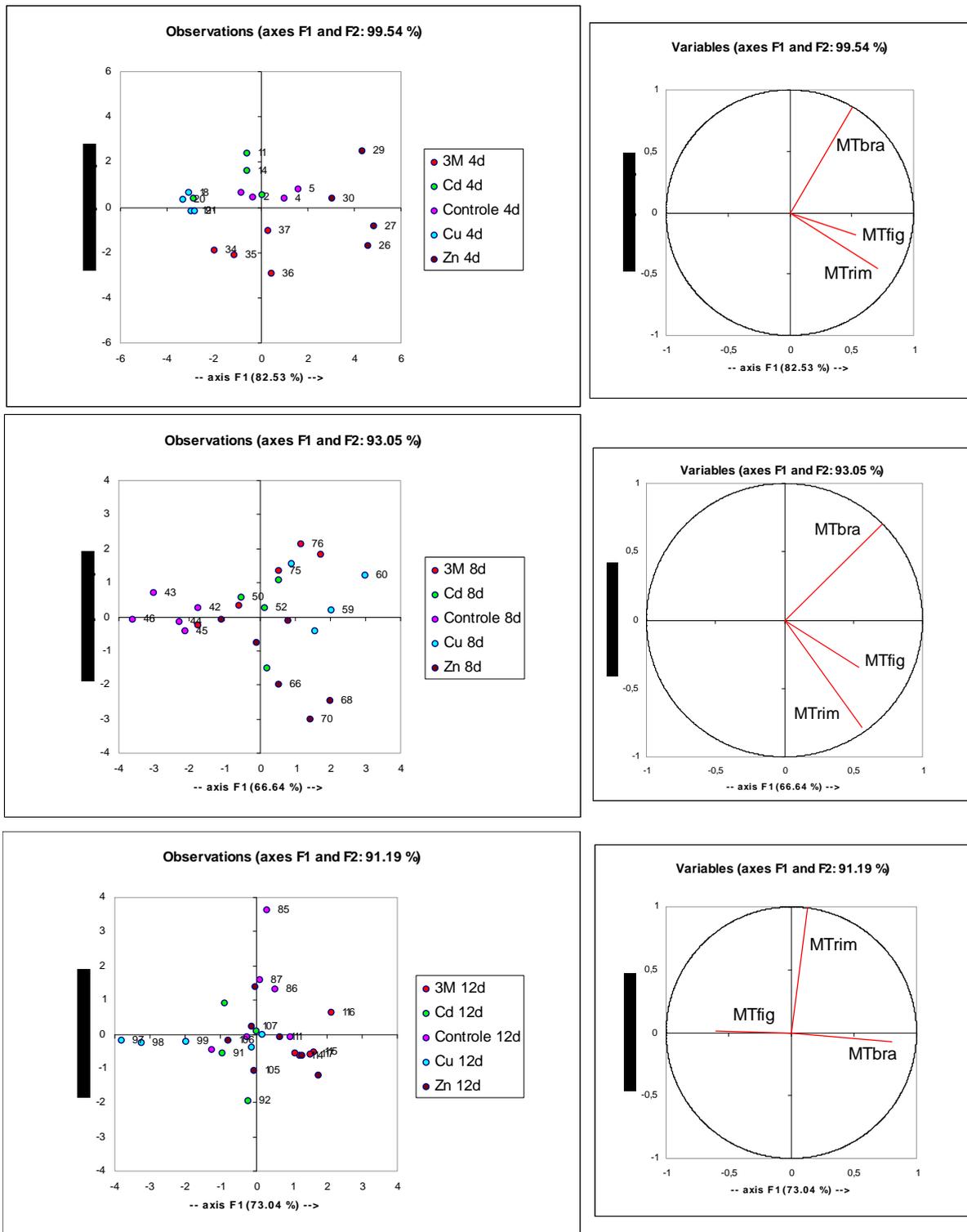


Figura 57: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle1, Cd, Cu, Zn e Cd/Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

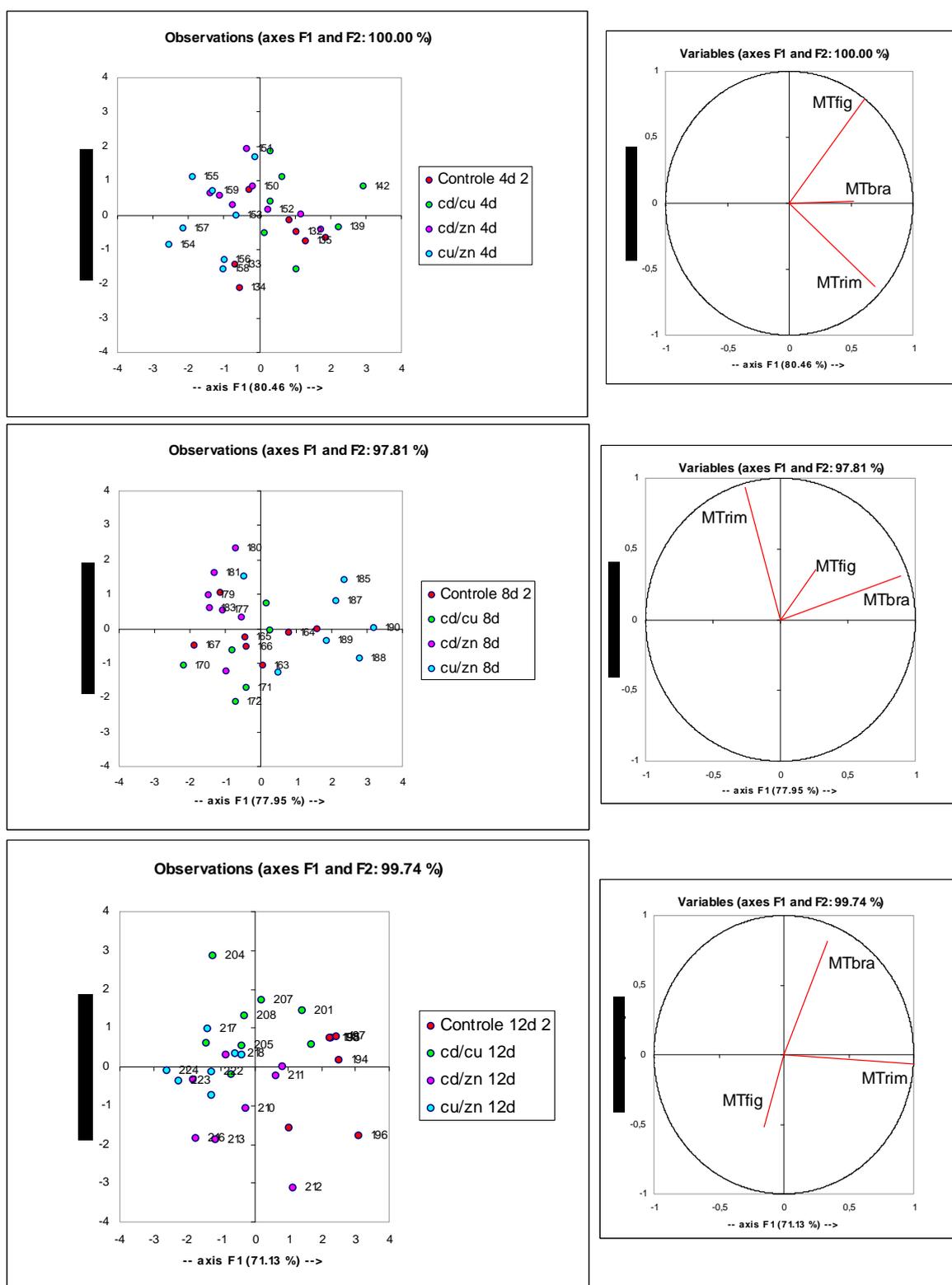


Figura 58: Distribuição no plano discriminante dos diferentes tratamentos (Controle2, Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn) em 4, 8 e 12 dias, e os respectivos vetores nos eixos F1 e F2 para a metalotioneína em brânquia, fígado e rim (MTbra, MTfig e MTrim) de *Oreochromis niloticus*.

5- DISCUSSÃO

5.1- Metabolismo oxidativo, níveis de hidroperóxido, glutational S-transferase e metalotioneína

A indução de enzimas antioxidantes é um mecanismo natural de respostas adaptativas em peixes e que pode variar entre os tecidos onde ocorre (ROMEIO et. al., 2000). As espécies reativas de oxigênio podem causar amplos danos às células, tais como a peroxidação lipídica dos lipídios de membrana. Esta reação ocorre em cadeia e é mediada pelas próprias espécies reativas de oxigênio, podendo perpetuar-se enquanto forem formadas as espécies reativas. A extensão dos danos causados por esta reação depende da ação dos agentes antioxidantes tais como as enzimas SOD, CAT, GST e GPx (ALMEIDA, 2002; VUTUKURU, 2006).

As respostas esperadas em relação à ativação das defesas antioxidantes, ligação aos metais pela MT e a indução da GST para a conjugação com os metais ocorrem a partir de 6 horas a até 48 horas após a exposição a substâncias tóxicas. Estes dados foram observados em trabalhos de Bouraoui, (2008), Cho et. al (2006), Hansen et. al. (2007), Dimitrova; Tishinova e Velcheva (1994). No atual estudo, com duração de 12 dias, observou-se que foram iniciados os mecanismos de defesa anti-oxidante, dentro do prazo previsto na literatura. E, além disso, foi possível acompanhar o comportamento destes efeitos após o momento de ativação, pelo período de exposição.

No presente estudo, a SOD apresentou um padrão de diferenciação onde na brânquia houve aumento da sua atividade (exceto para as exposições à dois metais combinados) e no fígado e rim ocorreu inibição em todos os tratamentos. O aumento da atividade da SOD pode estar ligado a uma resposta de defesa contra espécies reativas de oxigênio formadas na presença dos metais. Mesmo isolados, é sabido que o Cd, Cu e Zn promovem a resposta antioxidante da SOD. O cádmio é um indutor de radicais livres nos tecidos, o que pode também induzir a atividade da SOD (ASAGBA; ERIYAMREMU; IGBERAESE, 2008; LIVINGSTONE, 2001).

Para Cho et. al. (2006), os metais Cd, Cu e Zn induziram a expressão de RNAm da SOD em *Oplegnatus fasciatus*, constatando que estes metais induzem esta expressão principalmente no fígado e que o cádmio é o maior indutor.

Tendo a SOD aumentado sua atividade, espera-se que esta consiga barrar a formação de radicais livres e que os níveis de hidroperóxidos diminuam no tecido. No caso da brânquia, nos tratamentos em que ocorreu elevação dos níveis da SOD, não ocorreu a diminuição dos níveis de hidroperóxidos. Isto indica que, mesmo tendo aumentado a atividade da SOD, esta não conseguiu inibir a ação de espécies reativas de oxigênio. Este fato pode inclusive, ter determinado a morte de organismos nos experimentos.

E os efeitos dos agentes oxidantes também aparecem quando observou-se que no fígado e rim surgiu a presença de níveis elevados de hidroperóxidos ao longo de todo o tratamento de exposição aos três metais combinados e nos metais combinados dois à dois.

Estes resultados indicam que pode ter havido acúmulo destes metais nos órgãos, gerando espécies reativas, desencadeando os efeitos danosos das EROS. Quanto aos tratamentos onde ocorreu a inibição da SOD, Asagba; Eriyamremu e Igberaese (2008) indicam que o cádmio pode deslocar os metais de metaloenzimas, tais como a SOD (a qual necessita de Zn para sua estrutura e Cu para sua atividade) acarretando perda de sua atividade. Assim, em tratamentos com metais combinados, nas brânquias, fígado e rim de *O. niloticus*, este fator pode ter acarretado a diminuição da atividade da SOD.

Vutukuru et. al. (2006) detectou a inibição da atividade da SOD e da CAT em *Esomus danricus*, um peixe de água doce, causada pela exposição ao cobre, um outro metal que afeta os níveis dos agentes antioxidantes, dependendo da sua concentração ou associação com outros metais. A catalase, assim como a superóxido dismutase é uma enzima primária de defesa antioxidante, eliminando o peróxido de hidrogênio que pode penetrar nas membranas biológicas e inativar enzimas (ATLI et. al., 2006). As respostas da CAT para poluentes orgânicos ou inorgânicos podem variar desde a inibição até a sua indução, observadas tanto em campo como em laboratório (ROMEIO et. al, 2000; SANCHEZ et. al, 2005).

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que em alguns tratamentos onde ocorreu elevação da catalase, a SOD havia sido inibida também. Esta resposta só não ocorreu no fígado para os tratamentos com metais individuais e com os três metais associados. Assim, nas brânquias e no rim de *O. niloticus* ocorreu a indução da catalase no intuito de proteger as células contra a ação do peróxido de hidrogênio. Os metais podem causar alterações na mitocôndria, facilitando a liberação de O_2^- favorecendo a inibição da CAT, fato constatado por Romeo et. al. (2000). Este fator pode ser potencializado se houver radicais superóxidos e a SOD estiver presente em baixas concentrações (KONO; FRIDOVICH, 1982).

Atli et. al. (2006) encontraram, ao expor *O. niloticus* a concentrações de diversos metais, resultados que mostraram que o cobre pode diminuir a atividade da catalase no rim e aumentar nas brânquias e que o cádmio induziu a atividade da catalase no fígado. Neste mesmo estudo, a maior indução da atividade da catalase ocorreu no fígado, através da exposição ao zinco e no rim e brânquias não ocorreram alterações significativas para a exposição a este mesmo metal. A inibição da catalase também pode estar associada à ligação dos metais aos grupamentos -SH da enzima, alterando sua atividade (ATLI;CANLI 2007). O sinergismo entre estes metais pode desencadear respostas complexas e diversas na ação da catalase nestes tecidos.

O fígado, no presente estudo, também pode ter apresentado altos níveis de radical superóxido ou peróxido de hidrogênio que podem alterar e diminuir a atividade da catalase, além de metais que se acumulam no tecido e se ligam à catalase alterando sua função, conforme observado por Atli et. al. (2006).

A GPx é uma peroxidase com importante função de neutralizar a ação do peróxido de hidrogênio e atua, diferentemente da catalase, principalmente quando as concentrações de peróxido de hidrogênio são mais baixas. Nas brânquias onde ocorreu inibição da sua atividade em relação aos níveis basais, havia ocorrido a elevação da atividade da catalase. E no fígado, em relação ao nível basal, nos tratamentos onde a catalase foi inibida, ocorreu a elevação da atividade da GPx. Este fato pode ter determinado a proteção do fígado contra as EROS formadas, já

que os níveis de HP formados foram menores neste tecido, ocorrendo indução, o efeito contrário que ocorreu nos demais tecidos. Assim, a atuação da GPx pode ter sido o principal mecanismo de defesa antioxidante neste caso.

Ahmad; Pacheco, Santos (2006) detectaram elevação da GPx em brânquias, rim e fígado de *Anguilla anguilla* expostos a locais contaminados com metais pesados. Segundo os mesmos autores, além da dinâmica de variação dos níveis de GPx decorrente das pressões dos metais pesados, o próprio metabolismo dos peixes pode influenciar esta atividade. Assim, no caso dos peixes estarem em condições experimentais de pouco estresse de ordem ambiental (luz, barulho, etc...) pode levar a diminuição da atividade de produção da GPx.

Os estudos de Almeida et. al (2002) mostram, por sua vez, que o Cd pode ser um metal que provoca a elevação dos níveis de GPx. Isto foi observado nas brânquias quando comparada com os valores de referência basal, no presente estudo. Inclusive, mortalidade ocorreu para o grupo exposto ao cádmio.

A glutathione S-transferase é uma enzima de desintoxicação que auxilia na eliminação de compostos reativos formando conjugados com a glutathione e eliminando-os na forma de ácido mercaptúrico, protegendo as células de danos induzidos pelas EROS (AHMAD, et. al. 2006).

Observou-se o aumento da atividade desta enzima essencialmente nas brânquias, em relação aos níveis basais, onde ocorreram grandes aumentos das concentrações de HP. É possível que a GST tenha atuado neste tecido no sentido de eliminar estes compostos, para proteger as células. Novamente os agentes de defesa tem a sua concentração elevada nas brânquias, que é o principal órgão em contato com o ambiente aquático e responsável por diversos mecanismos de regulação do peixe como transporte de íons, trocas gasosas, regulação ácido-base e excreção via epitélio.

Estudos realizados por Basha;Rani (2003) detectaram que a GST teve sua atividade aumentada no rim e no fígado de *Oreochromis mossambicus* quando exposta a níveis elevados de Cd. Lopes et. al. (2001) descreve que o cobre pode gerar peroxidação lipídica, sendo que alguns produtos gerados são substratos da GST. Neste mesmo estudo foi detectado que a elevação da GST pode ter sido

uma forma de adaptação à exposição contínua ao Cd, mesmo em baixas concentrações. No presente estudo pode ter ocorrido este fenômeno, já que as concentrações de metais nos experimentos eram baixas também.

Em alguns tratamentos, observou-se também que a GPx e a GST se relacionaram de forma inversa (Cd/Cu, Cd/Zn, Cu/Zn para brânquia, tendo como referência o Controle e Cd tendo como referências os níveis basais). Neste caso, a ação da GPx resultou na diminuição de agentes oxidantes, o que pode ter levado à diminuição destes, para ação da GST. No entanto, em outros tratamentos, ocorreu a baixa ativação da GPx e maior ativação da GST.

O sistema de ação da GPx e GST tem relação com o ciclo da GSH. Na presença da GPx a GSH assume a forma oxidada (GSSG) e na presença da GR (glutathiona reduzida) constitui-se a forma reduzida (GSH). Se a GPx é deslocada para assumir a ação antioxidante em conjunto com a GSH, menor quantidade de GST pode ser formada, sendo que esta não vai atuar de forma intensa. Caso a GPx não atue, a possibilidade de formação de GST é maior e o organismo pode buscar esta alternativa como meio de neutralizar os agentes tóxicos (metais).

Na ampla maioria dos casos, observa-se uma redução da atividade da GST, exceto quando se observa a brânquia, no tratamento com dois metais combinados. Novamente, a brânquia assume um papel primordial com o aumento da atividade desta enzima, favorecendo a proteção contra os efeitos deletérios dos metais, conforme observado por Ahmad; (2004).

Em relação ao rim observa-se que nos tratamentos com os metais combinados dois a dois ocorreu uma diminuição da atividade da GPx e consequente aumento dos níveis de peroxidação lipídica e também da GST com a possível conjugação com metabólitos deste processo para tentar eliminá-los. Fernandes et. al (2008) analisou o efeito de metais sobre as brânquias e fígado de *Liza saliens* coletados de locais poluídos e observou que nas brânquias, SOD e GST tiveram níveis elevados de atividade, como maneira de reforçar a resposta aos agentes oxidantes. Neste estudo, observou-se que ocorreu o contrário: onde a SOD teve sua atividade aumentada, diminuiu a atividade da GST (tratamento com metais isolados e metais combinados dois a dois, respectivamente).

A metalotioneína é uma proteína induzida pela exposição a metais e sua função é se ligar a estes elementos e assim, impedir os efeitos tóxicos que eles causariam. Os resultados obtidos para a metalotioneína nos tecidos analisados demonstram ter ocorrido elevação da concentração desta proteína ao longo do experimento, com exceção dos tratamentos Cd/Cu, Cd/Zn e Cu/Zn nas brânquias e no rim de *O. niloticus*.

De forma a tentar entender o papel de metais no estresse oxidativo, a ação dos antioxidantes e a relação da MT com estes processos e com a bioacumulação, muitos trabalhos atualmente buscam elucidar tais questões. Huang et. al. (2007) analisaram o padrão de bioacumulação dos metais em *Ciprinus carpio*. Em indivíduos de *Perca flavescens*, Giguère et. al.(2006) relata que a MT, induzida por cobre, zinco, níquel e cádmio, juntamente com a bioacumulação destes metais, auxiliou na proteção contra os agentes oxidantes. Chowdhury; Baldisserotto; Wood (2005) observaram padrões diferenciados para a acumulação de cádmio proveniente da água e da alimentação em diferentes tecidos de *Oncorhynchus mykiss*, associando com a elevação da MT conforme as concentrações deste metal eram maiores.

Hollis; Hogstrand e Wood, (2001) também detectaram aumentos de até 4 vezes da MT em rim de *Oncorhynchus mykiss*, de até duas vezes para as brânquias e aumentos menores para o fígado, quando os peixes foram expostos ao cádmio, em concentrações de 3µg/L. Os estudos conduzidos em campo por Matijic; Raspor, (2007) indicaram que a exposição aos metais Cu, Cd, Zn, Fe e Mn resultou na ocorrência de altas concentrações de MT no intestino, rim e fígado, em ordem decrescente de concentração.

No presente estudo também foi detectado que os maiores aumentos da concentração de MT ocorreram nos tratamentos ao Cu e Zn no rim. Experimentos realizados por Campenhout et. al. (2004) encontraram resultados semelhantes, ao observarem que a metalotioneína no rim de *Cyprinus carpio* respondeu sensivelmente ao cádmio.

Inclusive, a MT pode ter sido um sistema de defesa importante contra os efeitos danosos dos metais, já que as enzimas antioxidantes tiveram suas atividades inibidas em grande parte dos tratamentos e dos tecidos.

Os metais utilizados nos experimentos de exposição (Cd, Cu e Zn) tem forte correlação com a indução da MT (ATLI; CANLI, 2003; BORDINEAUD et. al, 2006; De Boeck et. al., 2003). Também há a possibilidade de metais como o zinco ter auxiliado na defesa contra agentes oxidantes e contra os efeitos dos metais, através da MT, já que este metal pode auxiliar, em baixas concentrações, na transcrição gênica da MT e também da SOD, CAT e GPx, conforme observado por Hansen (2007).

Schlenk; Davis e Griffin (1999) também observaram uma relação de aumento da concentração de MT no fígado de peixes quando submetidos ao sulfato de cobre. Olsvick et.al. (2000) reportam que a MT é um importante marcador bioquímico para os metais, apresentando alto potencial para respostas frente à poluição.

A exposição de peixes aos metais, predominantemente zinco, cobre, cádmio e, ocasionalmente mercúrio, induz à síntese de MT no tecido hepático, renal e nas brânquias (DUTTON; STEPHENSON; KLAVERKAMP, 1993; HAMILTON; MEHRLE, 1986). Atualmente há um grande interesse em caracterizar a MT como um biomarcador de importância relevante nos estudos de impacto ambiental (GEORGE; OLSSON, 1994). Porém, é necessário levar em consideração os níveis de MT em organismos de locais poluídos e de locais naturais – locais de referência (CHAFFAI; AMIARD-TRIQUET; EL ABED, 1997).

Knapen et. al.(2004) verificaram que *Gobio gobio*, quando retirado de áreas poluídas, possui maior resistência à poluição por metais do que peixes retirados de locais limpos e expostos em seguida aos metais, devido a resposta genética da indução da MT. Hirato et. al (2003) determinaram uma correlação entre as concentrações de zinco e a presença de MT em brânquias de bivalves, no Lago Veneza, Itália, caracterizando estes animais como sentinelas.

Alguns trabalhos, como o de Hamza-Chaffai; Amiard-Triquet; El Abed (1995 e 1997) e Ueng et. al. (1996), demonstraram não haver uma relação

significativa entre os níveis de MT no fígado (principalmente) e brânquias de peixes e as altas concentrações encontradas nos ambientes poluídos. Um dos fatores que acarretam tal dificuldade é o fato de ocorrer indução da MT frente à outras alterações ambientais como hormônios, mensageiros secundários, fatores de crescimento, vitaminas e agentes citotóxicos, por exemplo (BAUDRIMONT et. al., 1997)

Os estudos de Carvalho (2003) em curimatá, *Prochilodus scrofa*, verificaram o acúmulo, mortalidade e toxicidade subletal do cobre após exposição de 96h. As concentrações de cobre no fígado destes peixes tiveram uma correlação direta com os níveis de MT. Carvalho; Araújo e Fernandes (2003, 2004) observaram alta concentração de MT no fígado de peixes expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 30 °C (710 e 1.010 $\mu\text{gMT.g}^{-1}$ de tecido, respectivamente) e baixa concentração de MT nos animais expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 20 °C (126,8 e 167,4 $\mu\text{gMT.g}^{-1}$, respectivamente).

Estudos conduzidos por Gonzales et. al. (2006) detectaram aumento na atividade dos genes responsáveis pela indução da MT no fígado de *D. rerio*. (*Brachydanio rerio*) quando expostos ao cádmio.

O papel da MT como defesa antioxidante é apresentado nos estudos de Atif et. al. (2006). Hollis, (2001) também detectou aumentos de até 4 vezes da MT em rim de *Oncorhynchus mykiss*, de até duas vezes para as brânquias e aumentos menores para o fígado, quando os peixes foram expostos ao cádmio, em concentrações de 3 $\mu\text{g/L}$.

De acordo com Baird, Kurz e Brunk (2006) a indução da MT por metais (no caso Zn) pode provocar um processo de estabilização dos lisossomos e os mesmos são bloqueados para o processo de apoptose, após os eventos onde são geradas espécies reativas de oxigênio, em reações peroxidativas catalisadas por Fe.

5.2- Biomarcadores como ferramentas para a análise ambiental para exposição de peixes a metais

Os resultados obtidos para a exposição de *Oreochromis niloticus* aos metais cádmio, cobre, zinco e suas associações permitem estabelecer importantes considerações sobre o uso dos biomarcadores para o monitoramento ambiental.

A exposição aos metais isolados e combinados proporcionou a observação de diferenças entre as exposições, demonstrando que podem haver diferenças nas respostas, devido ao sinergismo entre os metais. Quando no ambiente real, as complexidades são maiores, mas de qualquer forma, os biomarcadores podem fornecer uma indicação do estado de saúde dos organismos, como os peixes, antes que eventos de mortalidade venham a ocorrer. Isto por quê os biomarcadores bioquímicos terão suas respostas alteradas antes destes acontecimentos. E esta é a utilidade de se trabalhar com biomarcadores bioquímicos: a possibilidade de monitorar o ambiente antes de ocorrerem conseqüências letais para os organismos ou para a comunidade. Ou seja, o grau de prevenção é maior.

Atualmente os órgãos responsáveis pelo monitoramento dos corpos d'água no Brasil têm se embasado pela legislação que rege o monitoramento de corpos d'água para a avaliação da qualidade (BRASIL, 2005) e que levam em consideração as concentrações de poluentes na água e determinados testes de toxicidade como forma de avaliação da qualidade. Embora muito se tenha avançado com a inclusão dos testes de toxicidade a partir de 2005, na avaliação da qualidade de nossas águas, o caráter de proteção e prevenção ainda não está presente.

No caso das enzimas do estresse oxidativo, analisadas no presente trabalho, estas se mostraram adequadas para que se consiga obter este caráter preventivo na avaliação de corpos d'água. Embora realizados em laboratório, os resultados expressam o estado de saúde dos peixes, quando expostos aos metais, com as respectivas alterações bioquímicas ao longo do experimento.

Na transposição para campo as avaliações por períodos extensos podem não ser financeiramente justificável, mas de forma pontual, tais análises podem ser viáveis e auxiliar na proteção da biota aquática. As análises são relativamente rápidas e também fornecem resultados em curtos períodos de tempo.

Futuros estudos devem considerar a aplicação deste tipo de análise em campo, com o intuito de se verificar sua aplicabilidade real nos trabalhos de avaliação da qualidade da água. As perspectivas podem ser promissoras.

6- CONCLUSÕES

1- As avaliações do metabolismo oxidativo expostos aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações permitiram verificar que ocorreram alterações destes biomarcadores, sem haver necessariamente uma condição de resposta tecido-específica

2- O sistema SOD, CAT e GPx demonstrou não ter controlado de forma efetiva os efeitos danosos das espécies reativas geradas nos experimentos. Este fato pode ser verificado pelo aumento em alguns casos dos níveis de HP. A metalotioneína pode ter desempenhado um papel importante na ligação aos metais e até mesmo como agente antioxidante para evitar maiores danos.

3- Apesar da tentativa de se promover os processos de defesas contra os efeitos tóxicos dos metais isolados ou associados, ocorreram mortes em determinados tratamentos, evidenciando a falha de partes destes mecanismos

4- Dentre os tecidos analisados, a brânquia apresentou intensa relação com os efeitos observados, tanto pela ativação ou inibição de suas enzimas ligadas ao estresse oxidativo, da HP, da GST e da MT. Por ser o principal órgão de contato com a água, isto pode ter levado a esta forma de resposta encontrada.

5- Em relação às diferenças observadas para os distintos grupos de tratamentos, não se constatou um padrão de respostas referentes aos metais isolados ou combinados.

6- Os biomarcadores do estresse oxidativo, os níveis de HP, a GST e a MT demonstraram apresentar importantes respostas quando relacionadas à exposição a metais. Este fato pode fazer com que sejam úteis no estabelecimento de novos padrões para a avaliação da qualidade de água aos órgãos responsáveis.

7- BIBLIOGRAFIA

AEBI, H. (1974). Catalase. BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of Enzymatic Analysis.**, 2.ed. London. Academic Press. p.671-684

AHMAD, S. (1995). Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. AHMAD, S (Ed.). **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology.** Chapman & Hall. p.238-272.

AHMAD, I.; PACHECO, M; SANTOS, M. A. (2004) Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicology and Environment Safety.** v.57, p. 290-302.

AHMAD, I. et al.(2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere** [S.I.], v. 65, n. 6, p. 952-962, 2006.

ALMEIDA, J. A. et. al. (2002). The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environmental International** v27. p.673-679.

AMIARD, J.-C; CAQUET, Th. LAGADIC, L. (2000). Biomarkers as tools for Environmental quality assessment. LAGADIC, L. et. al. (Ed.)**Use of biomarkers for environmental quality assessment.** Science Publishers, Inc. p. xvii-xxvii.

ASAGBA, S. O. et al. (2008). Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry** [S.I.], v. 34, n. 1, p. 61-69, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2004). **NBR 15088:2004.** Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes.

ATIF, F.; KAUR, M; YOUSUF, S.; RAISUDDIN, S. (2006). In vitro free radical scavenging activity of hepatic metallothionein induced in an Indian freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions.** v.162 p.172-180.

ATLI, G.; CANLI, M. (2003). Natural occurrence of metallothionein-like proteins in 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.** [S.I.], v. 70, n. 3, p. 619-627

ATLI, G. et. al. (2006). Response of catalase activity to Ag⁺², Cd⁺², Cr⁺⁶, Cu⁺² and Zn⁺² in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C.** v.143. p. 218-224.

_____. (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C.** v.145. p.282-287.

BAINY, A. C. D. et. al. (1996). Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology.** v.34, p.151-162.

BAIRD, S. K.; KURZ, T.; BRUNK, U. T. (2006) Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. **Biochemical Journal.** v.395, p. 275-283.

BARRETO (1999). **Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e a sua quantificação no sedimento e água.** Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 274p. 1999.

BASHA, P. S.; RANI, U. A. (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis niloticus* (Tilapi). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v.56. p.218-221.

BAUDRIMONT, M.; et. al. (1997). Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to cadmium and inorganic mercury. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v.16(10), p.2096-2105.

BIESALSKI, H. K. (2000). The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition.** v.16, p.593-596.

BORDINEAUD, J. -P, et. al. (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. **Biochemie.** v.88, p.1787-1792.

BOURAOUI, Z. et. al (2008). Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. **Fish Physiology and Biochemistry.** v.34, p.201-207.

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

BRASIL (2005). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, DF.

CAMPAGNA, A. F. (2005). **Toxicidade dos sedimentos da bacia hidrográfica do rio Monjolinho.** 268p. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP. 2005.

CAMPENHAUT, K. V. et. al. (2004). Induction and binding of Cd, Cu and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. **Toxicological Sciences**. v. 80, p. 276-287.

CARVALHO, C.S. (2003). **Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, Prochilodus scrofa (STEINDACHNER, 1881)**, São Carlos - UFSCar, Tese de Doutorado, 107 p.

CARVALHO, C.S.; ARAUJO, H.S.S.; FERNANDES, M.N. (2003). Copper accumulation and metallothionein concentration in the liver of the neotropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Submetido.

CARVALHO, C.S.; ARAUJO, H.S.S.; FERNANDES, M.N. (2004). Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. **Comparative Biochemistry and Physiology. B**. v.137, p.225-234.

CARVALHO, C.S. (2005) **Relatório FAPESP - Pós-doutorado**. PPG-SEA. Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos. CRHEA/EESC/USP. 82p.

CHAFFAI, A. H.; AMIARD-TRIQUET, C.; EL ABED, A. (1997). Metallothionein-Like Protein: Is it an efficient Biomarker of metal Contamination ? A case study based on fish from the Tunisian coast. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.33, p.53-62.

CHO, Y. S. *et al.* (2006). Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbreem (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture** [S.I.], v. 253, n. 1-4, p. 667-679.

CHOWDHURY, M. J.; BALDISSEROTTO, B.; WOOD, C. M. (2005). Tissue-Specific Cadmium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. [S.I.], v. 48, n. 3, p. 381-390.

CHUNG MJ.; WALKER, PA; HOGSTRAND, C. (2004). Metal physiology and biochemistry in fish cells: from toxicity to protection by zinc. **Comparative Biochemistry and Physiology. C**. v.100, p.137-147.

CROUCH, R. K., GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; BUSE, M. G. (1981). The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Physiology Review**. v.30, p.235-241.

DE BOECK, G. et al. (2003). Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology** [S.I.], v. 65, n. 4, p. 413-424.

DECAPRIO, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. **Environmental Science and Technology**. p.1837-1848.

DUTTON, M. D.; STEPHENSON, M.; KLAVERKAMP, J. F. (1993). Metallothionein in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.12, p.1193-1202.

EROGLU, K.; ATLI, G.; CANLI, M. (2005). Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-Like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.75, p.390–399.

FERNANDES, C, et. al. (2008) Oxidative stress responses in Gill and Liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.55, p. 262-269.

GEORGE, S. G.; OLSSON, P. E. (1994). Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. KRAMER, K. J. M. (Ed). **Biomonitoring of coastal waters and estuaries**. CRC Press. 151-171.

GEORGE, S. G.; TODD, K.; WRIGHT, J. (1996). Regulation of Metallothionein in Teleosts: Induction of MTmRNA and protein by Cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine Flatfish, the Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.113C(2), p.109-115.

GIGUÉRE, A, et. al. (2006). Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. **Aquatic Toxicology**. v.77. p.178–189.

GILFORD, J. (1993) **Environmental toxicology and risk assessment**. LANDIS et. al.(Ed.). STP 1179. ASTM International. p. 7-21.

GIULIO, R. T. di, et. al. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. CRC Press. p.523-561.

GIULIO, R. T. di; HINTON, D. E. (2008). **The toxicology of fishes**. CRC Press/Taylor & Francis Group. 1096p.

GONZALES, P. et. al. (2006) Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscle and brain of the zebrafish (*D. rerio*) **BioMetals**. v.19, p.225-235

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. (1974). Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**. v.249. p.7130-7139.

HAFEMAN, D.G., SUNDE, R.A., HOEKSTRA, W.G. (1974). Dietary Selenium on Erythrocyte and Glutathione Peroxidase in the Rat. **Journal of Nutrition**., v.104, p.580-567.

HALLIWELL, B. (1999). Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) **Free Radical Research**. v.31(4)p.261-272.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (1999) **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press. 936p.

HAMILTON, S.; MEHRLE, P. (1986). Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. **Transactions of the American Fisheries Society**. v.115, p.596-609.

HAMZA-CHAFFAI, A et. al. (1995). Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.111C, p.329-341.

HAMZA-CHAFFAI, A.; AMIARD-TRIQUET, C; EL ABED, A. (1997). Methallothionein-like proteins: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the tunisian coast. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.33, p.53-62.

HANSEN, B. H. et al. (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). **Chemosphere** [S.I.], v. 67, n. 11, p. 2241-2249.

HEATH, A. G. (1995). **Water pollution and Fish Physiology**. CRC Press. 384p.

HERMES-LIMA, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. STOREY, K. B. (Ed.) **Functional metabolism – regulation and adaptation**. Wiley-Liss. p.319-368.

HIRATO, P, et. al. (2003). Metal accumulation and Binding Protein Induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.44, p. 476-484.

HUANG, Z. Y., et. al. (2007). Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead **Applied Organometallic Chemistry**. v.21 p.101–107

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

KAGI, J.H.R.; SCHAFFER, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, v.27 (23) p.8509-8515.

KLATT, P.; LAMAS, S. (2002). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **European Journal of Biochemistry**. v.267, p.4928-4944.

KLING, P. G. (2000). Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RGT-2 and CHSE-214 cells. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v.28, n11, p.1628-1637.

KNAPEN, D, et. al. (2004). Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. **Aquatic Toxicology**. v.67 p.155-165.

KONO, Y; FRIDOVICH, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. **The Journal of Biological Chemistry**.v.257,n.10, p.5751-5754.

KRUGER N.J. (1994). The Bradford method for protein quantification. **Methods in Molecular Biology**. v.32, p.9-15.

LACKNER, R. (2008). "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. BRAUNBECK et. al. (Ed.) **Fish Ecotoxicology**. Birkhäuser Verlag. P.203-224.

LATHA, M.; PARI, L. (2004). Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, p.577-586.

LEY, L. H.; FAILLA, M. L; CHERRY, D. (1983). Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.74B, p.507-513.

LINDE, A.R. et. al. (2001). Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and Brown trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.49, p.60-63.

LIVINGSTONE, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**. [S.I.], v. 42, n. 8, p. 656-666.

LOPES, P. A. et. al. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants. **Science of The Total Environment**.v.280. p.153-163.

MANZLI, C. et. al. (2004). Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. **Toxicology**. v.196.p.57-64.

MARIJIC, V.F.; RASPOR, B. (2007). Metal exposure assessment in native fish, *Mullus barbatus* L., from the Eastern Adriatic sea. **Toxicology Letters** [S.I.], v. 168, n. 3, p. 292-301.

MALTBY, L.; NAYLOR, C. (1990). Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* "scope for growth" assay: effect of zinc on reproduction. **Functional Ecology**. v.4, p.393-397.

OLSVICK, P. A. et. al. (2000). Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments after a runoff episode. **Aquatic Toxicology**. v.50, p.301-316

OLSVICK, P. A, et. al. (2001). Metal accumulation and metallothionein in brown Trout, *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers differently contaminated with Cd, Cu and Zn **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C** v.128, p.189_201.

PEAKAL, D. B. (1999). The use of biomarkers in hazard assessment. PEAKAL, D. B. et. al. (Ed.). **Biomarkers: A pragmatic basis for remediation of severe pollution in Eastern Europe**. Kluwer Academic Press. P123-133.

PELÁEZ-RODRIGUES (2001). **Avaliação da qualidade da água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu/SP (Ribeirão do Feijão e rio do Monjolinho) através de variáveis físicas, químicas e biológicas**. 145p. + anexos. Tese. (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos – SP. 2001

POPMA, T.; MASSER, M. (1999) **Tilapia: Life History and Biology**. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication n°283. Alabama,USA. 4p.

PROSI, F. (1983). Heavy metals in Aquatic Organisms. FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G. T. W (Ed.). **Metal pollution in Aquatic Environment**. p.283-284.

PRYOR, W. A. (Ed.). (1976). **Free Radicals in Biology**. NY Academic Press. v. 1.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. RAND, G. M. (Ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Taylor & Francis. p.3-70.

ROCH, M.et. al. (1982). Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science**. v.39, p.1596-1601.

ROMEO, M. et al. (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology** [S.I.], v. 48, n. 2-3, p. 185-194.

ROSE W. L. et. al. (2006). Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmelt. **Aquatic Toxicology** v.80, p.298–308.

SANCHEZ, W. et al. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology** [S.I.], v. 19, n. 1, p. 177-183, 2005.

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

THOMPSON, J; BANNIGAN, J. (2008) Cadmium: toxic effects on the reproductive system and embryo. **Reproductive Toxicology**. v.25, p.304-315.

TUAN, Y (1980). **Topofilia** – um estudo da percepção, atitudes e valores do meio ambiente. Ed. DIFEL, São Paulo – SP, 288p.

UENG, Y.F, et. al. (1996). Effects of Cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in Tilapia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.57, p.125-131.

VALAVANIDIS, A. et. al. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.64. p.178-179.

VAN der OOST, R *et. alii.* (2005). Biomarkers in environmental assay. BESTES, P. J. ; MUNAWAR, M. (ed.) **Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies**. Taylor & Francis. p.87-152.

VIARENGO, A, et. al. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**. v.44, p.69–84.

VIJAYAVEL, K. et. al. (2006). Dietary ascorbic acid and α -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in thornfish *Terapon jarbua*. **Science of The Total Environment**. v.372. p.157-163.

VUTUKURU, S. S. et al. (2006) Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry** [S.I.], v. 32, n. 3, p. 221-229.

WEARING, S; NEIL, J. (2000). **Ecoturismo** – Impactos, potencialidade e possibilidades. Ed. Manole. São Paulo. 232p.

WEEKS, J. M. (1995). The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? (Viewpoint) **Applied Soil Ecology**. v.2. p.215-216.

WITTMANN, G. (1981). Toxic metals. FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G. (Ed.). **Metal pollution in the aquatic environment**. Springer-Verlag. p.3-70.

YOUNG, P. R.; BRIEDS, A. V. (1989). Purification and kinetics mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. **Biochemical Journal**. v.257(2) p541-548.

ZELIGER, H. I. (2008). **Human toxicology of chemical mixtures**. William Andrew ed. P.23-50

APÊNDICE A

Tabela 10: Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Erro padrão da Média dos peixes utilizados nos experimentos, divididos por grupos de bioensaios.

	Peso(g)	Comp t (cm)	Comp p (cm)		Peso(g)	Comp t (cm)	Comp p (cm)		
Controle 4d	250,92	24,04	21,50	media	Cu 8d	241,97	23,50	19,80	media
	58,12	1,49	3,78	DP		59,70	1,93	1,91	DP
	23,16	6,18	17,60	CV		24,67	8,20	9,63	CV
	21,97	0,56	1,43	SEM		26,70	0,86	0,85	SEM
Cd 4d	241,33	23,20	19,35		Zn 8d	278,08	24,33	20,59	
	61,22	2,42	1,96			48,24	1,27	1,60	
	25,37	10,42	10,13			17,35	5,24	7,76	
	21,65	0,85	0,69			18,23	0,48	0,60	
Cu 4d	248,57	23,36	19,18		3M 8d	256,50	24,06	19,73	
	91,35	3,26	2,74			60,25	2,40	2,32	
	36,75	13,94	14,31			23,49	9,98	11,78	
	32,30	1,15	0,97			22,77	0,91	0,88	
Zn 4d	284,22	24,27	19,93		Controle 12 d	282,14	24,71	20,70	
	100,49	3,63	2,82			46,44	1,63	1,49	
	35,36	14,95	14,13			16,46	6,59	7,22	
	41,03	1,48	1,15			16,42	0,58	0,53	
3M 4d	225,16	23,23	19,09		Cd 12d	318,15	26,38	22,32	
	46,37	2,37	1,70			60,11	2,20	1,87	
	20,59	10,20	8,90			18,89	8,32	8,37	
	17,53	0,90	0,64			26,88	0,98	0,84	
Controle 8d	261,12	24,34	20,21		Cu 12d	282,31	25,28	21,22	
	64,04	2,79	2,34			86,18	3,29	3,06	
	24,53	11,48	11,60			30,53	13,02	14,42	
	22,64	0,99	0,83			38,54	1,47	1,37	
Cd 8 d	232,29	22,78	18,90		Zn 12d	291,49	24,88	20,69	
	80,87	3,57	2,88			88,22	2,93	2,47	
	34,81	15,67	15,22			30,27	11,76	11,92	
	36,16	1,60	1,29			31,19	1,03	0,87	

Tabela 11: Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Erro padrão da Média dos peixes utilizados nos experimentos, divididos por grupos de bioensaios.

	Peso(g)	Comp t (cm)	Comp p (cm)			Peso(g)	Comp t (cm)	Comp p (cm)	
3M 12d	303,12	25,89	21,70	media	Cd/Zn 8d	257,99	23,70	19,76	media
	49,79	2,05	1,73	DP		71,05	2,48	2,12	DP
	16,43	7,92	7,97	CV		27,54	10,48	10,71	CV
	18,82	0,77	0,65	SEM		26,85	0,94	0,80	SEM
Controle 2 4d	247,73	22,99	19,09		Cu/Zn 8d	247,13	22,99	18,94	
	62,70	2,17	1,59			72,69	1,99	1,95	
	25,31	9,46	8,34			29,41	8,67	10,31	
	23,70	0,82	0,60			27,47	0,75	0,74	
Cd/Cu 4d	252,93	22,87	19,04		Controle 2 12d	250,50	23,30	19,33	
	82,49	3,26	2,73			72,58	2,44	2,30	
	32,62	14,25	14,35			28,97	10,47	11,90	
	31,18	1,23	1,03			29,63	1,00	0,94	
Cd/Zn 4d	280,06	23,73	19,74		Cd/Cu 12d	236,51	23,05	19,11	
	59,38	1,54	1,45			53,90	1,70	1,69	
	21,20	6,49	7,33			22,79	7,39	8,82	
	20,99	0,54	0,51			19,06	0,60	0,60	
Cu/Zn 4d	287,08	24,13	20,30		Cd/Zn 12d	275,23	24,10	19,80	
	65,78	2,00	1,35			65,11	1,92	1,51	
	22,91	8,29	6,64			23,66	7,95	7,61	
	23,26	0,71	0,48			23,02	0,68	0,53	
Controle 2 8d	260,09	23,74	19,86		Cu/Zn 12d	264,06	23,56	19,84	
	69,38	2,87	2,49			71,18	1,87	1,37	
	26,68	12,08	12,53			26,96	7,95	6,93	
	26,22	1,08	0,94			26,90	0,71	0,52	
Cd/Cu 8d	239,17	22,83	19,27						
	35,92	1,17	1,36						
	15,02	5,13	7,08						
	14,66	0,48	0,56						

Comp t = comprimento total

Comp p = comprimento padrão

APÊNDICE B

Tabela 12: Atividade da SOD (USOD . mg proteína⁻¹) em brânquias de *O. niloticus*. exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	2,87	0,47	1,30	0,28
Cd4D	2,49	1,04	1,75	0,21
Cu4D	1,54	0,77	1,20	0,08
Zn4D	2,93	1,24	1,98	0,27
Cd/Cu/Zn4D	3,31	1,44	2,06	0,25
Controle 8D	4,69	1,89	2,90	0,34
Cd8D	7,08	2,27	4,15	0,81
Cu8D	3,72	2,29	2,95	0,27
Zn8D	3,84	1,99	2,93	0,24
Cd/Cu/Zn8D	5,17	2,45	3,37	0,36
Controle 12D	3,92	2,37	3,02	0,22
Cd12D	4,52	2,74	3,46	0,33
Cu12D	3,17	2,13	2,55	0,21
Zn12D	3,98	2,43	3,04	0,17
Cd/Cu/Zn12D	3,65	2,14	3,11	0,19
Controle4D 2	1,48	0,33	1,05	0,16
Cd/Cu4D	1,27	0,58	0,90	0,08
Cd/Zn4D	1,76	0,70	0,96	0,12
Cu/Zn4D	1,43	0,59	1,01	0,12
Controle8D 2	1,37	0,55	0,92	0,13
Cd/Cu8D	0,87	0,44	0,67	0,06
Cd/Zn8D	0,85	0,45	0,59	0,05
Cu/Zn8D	0,74	0,43	0,58	0,05
Controle12D 2	0,64	0,41	0,54	0,04
Cd/Cu12D	0,66	0,40	0,54	0,04
Cd/Zn12D	0,65	0,38	0,50	0,03
Cu/Zn12D	0,41	0,26	0,33	0,02
Referência 1	1,60	0,03	0,69	0,16
Referência 2	1,21	0,70	0,86	0,05

Tabela 13: Atividade da SOD (USOD . mg proteína⁻¹) em fígado de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	3,05	2,11	2,70	0,10
Cd4D	2,60	0,60	1,89	0,25
Cu4D	3,25	1,74	2,59	0,19
Zn4D	2,00	1,20	1,73	0,12
Cd/Cu/Zn4D	2,75	0,97	1,66	0,26
Controle 8D	2,95	1,02	2,00	0,22
Cd8D	1,36	0,77	1,16	0,11
Cu8D	2,45	0,15	1,69	0,41
Zn8D	2,42	0,92	1,44	0,19
Cd/Cu/Zn8D	2,11	-0,81	1,36	0,39
Controle 12D	1,60	1,05	1,41	0,06
Cd12D	1,28	1,08	1,18	0,03
Cu12D	1,63	0,11	1,18	0,28
Zn12D	0,98	0,32	0,66	0,08
Cd/Cu/Zn12D	1,16	0,64	0,85	0,07
Controle4D 2	2,25	1,31	1,58	0,13
Cd/Cu4D	1,86	0,93	1,31	0,12
Cd/Zn4D	1,31	0,86	1,04	0,06
Cu/Zn4D	2,47	0,82	1,40	0,21
Controle8D 2	1,43	0,78	1,13	0,08
Cd/Cu8D	2,37	0,66	1,43	0,26
Cd/Zn8D	1,05	0,62	0,78	0,06
Cu/Zn8D	0,90	0,35	0,66	0,08
Controle12D 2	1,30	0,75	1,09	0,08
Cd/Cu12D	1,60	0,48	0,82	0,13
Cd/Zn12D	1,12	0,53	0,85	0,08
Cu/Zn12D	1,18	0,42	0,82	0,11
Referência 1	2,84	2,22	2,65	0,07
Referência 2	1,87	1,07	1,39	0,08

Tabela 14: Atividade da SOD (USOD . mg proteína-1) em rim de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	±SEM
Controle 4D	417,62	192,76	279,87	30,50
Cd4D	220,70	133,42	172,65	11,78
Cu4D	250,35	136,90	183,97	13,80
Zn4D	361,37	141,81	215,91	32,44
Cd/Cu/Zn4D	344,42	110,11	184,19	28,83
Controle 8D	159,30	107,58	133,15	5,75
Cd8D	150,67	113,76	128,17	6,07
Cu8D	160,03	109,26	132,49	9,94
Zn8D	121,65	80,69	109,15	5,55
Cd/Cu/Zn8D	142,82	78,25	121,38	7,84
Controle 12D	278,79	94,75	155,32	19,63
Cd12D	153,55	107,42	127,25	9,76
Cu12D	191,04	89,01	128,04	17,40
Zn12D	116,49	67,39	89,89	6,71
Cd/Cu/Zn12D	86,67	71,83	82,05	2,04
Controle4D 2	274,71	82,81	166,76	26,56
Cd/Cu4D	357,28	83,09	164,93	34,43
Cd/Zn4D	147,85	90,29	113,27	7,44
Cu/Zn4D	138,65	64,96	94,86	9,37
Controle8D 2	98,87	64,09	81,46	5,17
Cd/Cu8D	147,50	58,13	82,38	13,67
Cd/Zn8D	78,40	25,34	62,31	6,90
Cu/Zn8D	140,91	60,54	89,69	10,40
Controle12D 2	71,95	50,52	63,35	3,64
Cd/Cu12D	90,07	68,02	76,95	2,60
Cd/Zn12D	92,17	54,15	70,61	4,85
Cu/Zn12D	84,14	42,15	58,42	5,70
Referência 1	200,65	135,31	165,50	8,90
Referência 2	218,04	85,96	136,63	14,39

Tabela 15: Atividade da CAT (UB . mg proteína⁻¹) em brânquias de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	2,92	1,19	1,93	0,23
Cd4D	12,27	1,53	3,83	1,42
Cu4D	7,56	2,44	3,67	0,58
Zn4D	4,33	2,14	3,13	0,39
Cd/Cu/Zn4D	5,09	2,47	3,74	0,37
Controle 8D	6,53	1,80	3,91	0,55
Cd8D	4,15	2,26	2,88	0,33
Cu8D	4,45	2,26	3,55	0,36
Zn8D	4,49	2,04	2,81	0,31
Cd/Cu/Zn8D	3,96	0,32	2,44	0,47
Controle 12D	5,10	2,25	3,13	0,33
Cd12D	5,56	2,67	3,79	0,48
Cu12D	6,19	2,05	3,76	0,81
Zn12D	4,78	2,26	3,70	0,28
Cd/Cu/Zn12D	4,32	1,48	3,22	0,39
Controle4D 2	2,35	0,68	1,87	0,23
Cd/Cu4D	2,91	0,90	2,04	0,26
Cd/Zn4D	3,67	1,89	2,48	0,21
Cu/Zn4D	3,39	2,08	2,57	0,18
Controle8D 2	2,84	1,76	2,19	0,13
Cd/Cu8D	2,72	1,86	2,34	0,12
Cd/Zn8D	2,49	1,83	2,15	0,08
Cu/Zn8D	2,92	1,55	2,08	0,17
Controle12D 2	2,64	0,81	1,81	0,29
Cd/Cu12D	2,75	1,64	2,11	0,15
Cd/Zn12D	3,06	1,30	2,20	0,22
Cu/Zn12D	3,21	1,70	2,52	0,22
Referência 1	5,68	1,06	3,61	0,51
Referência 2	2,63	1,44	2,02	0,13

Tabela 16: Atividade da CAT (UB . mg proteína-1) em fígado de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

<i>Tratamento</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Média</i>	<i>± SEM</i>
Controle 4D	153,06	61,85	120,88	10,65
Cd4D	229,70	22,97	142,46	24,28
Cu4D	157,92	12,48	106,15	17,26
Zn4D	213,30	76,81	148,80	19,77
Cd/Cu/Zn4D	166,71	53,33	121,57	14,65
Controle 8D	208,15	66,19	117,72	15,97
Cd8D	366,87	128,15	208,36	45,58
Cu8D	141,01	76,73	106,22	11,00
Zn8D	224,05	75,16	126,42	21,41
Cd/Cu/Zn8D	125,68	25,55	97,08	13,90
Controle 12D	293,50	118,52	204,39	21,21
Cd12D	302,27	104,01	174,54	35,21
Cu12D	158,51	110,77	130,93	10,84
Zn12D	211,84	79,12	153,28	14,36
Cd/Cu/Zn12D	176,70	84,25	132,94	12,24
Controle4D 2	205,31	84,82	148,87	13,92
Cd/Cu4D	196,90	80,43	148,52	16,81
Cd/Zn4D	226,18	107,85	169,94	16,82
Cu/Zn4D	140,36	86,03	112,92	6,55
Controle8D 2	236,14	112,38	176,02	16,33
Cd/Cu8D	240,58	75,63	138,22	31,23
Cd/Zn8D	183,87	130,89	150,52	7,26
Cu/Zn8D	184,98	113,71	156,01	8,50
Controle12D 2	218,27	74,40	143,33	22,92
Cd/Cu12D	237,30	65,74	155,84	19,95
Cd/Zn12D	184,30	68,41	132,73	12,20
Cu/Zn12D	195,40	57,25	128,94	21,65
Referência 1	239,84	131,79	184,59	12,76
Referência 2	215,94	0,00	129,33	24,11

Tabela 17: Atividade da CAT (UB . mg proteína-1) em rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	4814,65	208,59	1267,51	540,00
Cd4D	1894,00	698,51	1339,20	145,15
Cu4D	1899,70	720,11	1132,03	142,66
Zn4D	2229,87	699,55	1440,82	235,78
Cd/Cu/Zn4D	3074,81	778,94	1576,86	277,43
Controle 8D	1522,41	429,76	1105,35	139,68
Cd8D	1485,38	347,19	1019,10	211,26
Cu8D	1922,74	725,44	1290,90	195,13
Zn8D	1843,81	252,47	1167,49	232,21
Cd/Cu/Zn8D	1811,80	309,96	1027,39	223,41
Controle 12D	1519,78	145,08	964,81	146,72
Cd12D	2102,57	556,09	1326,25	303,58
Cu12D	1823,99	520,66	1169,97	256,45
Zn12D	1963,21	977,54	1439,91	124,30
Cd/Cu/Zn12D	2104,96	528,89	1361,41	200,69
Controle4D 2	5920,75	747,00	3439,26	702,85
Cd/Cu4D	4298,86	448,15	2350,83	498,43
Cd/Zn4D	6710,66	592,53	3701,41	649,81
Cu/Zn4D	3679,33	1507,73	2554,01	319,42
Controle8D 2	9184,69	1527,26	4412,98	928,48
Cd/Cu8D	8545,90	927,70	4231,99	1075,27
Cd/Zn8D	13055,55	2940,67	5526,83	1436,38
Cu/Zn8D	7247,74	1402,12	4146,18	731,27
Controle12D 2	4819,98	1580,05	3526,57	510,03
Cd/Cu12D	3730,31	2319,03	2893,07	178,00
Cd/Zn12D	2767,40	1607,13	2139,14	145,25
Cu/Zn12D	3722,34	1405,24	2175,77	292,30
Referência 1	1807,33	883,05	1383,57	110,48
Referência 2	7125,22	2026,20	3852,24	711,38

Tabela 18: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína-1) em brânquias de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	29,36	16,68	20,87	1,63
Cd4D	33,59	15,38	21,37	2,48
Cu4D	14,87	11,89	13,48	0,40
Zn4D	21,31	13,50	16,04	1,37
Cd/Cu/Zn4D	20,68	11,58	14,78	1,11
Controle 8D	20,58	11,74	15,28	1,18
Cd8D	25,60	11,68	16,99	2,54
Cu8D	18,04	11,45	13,63	1,24
Zn8D	18,71	12,50	14,62	0,80
Cd/Cu/Zn8D	21,28	10,89	15,29	1,42
Controle 12D	16,24	11,02	13,06	0,71
Cd12D	20,35	11,07	15,11	1,78
Cu12D	13,90	10,45	11,68	0,67
Zn12D	17,39	10,25	12,39	0,78
Cd/Cu/Zn12D	14,05	11,18	12,53	0,35
Controle4D 2	11,52	7,20	8,85	0,63
Cd/Cu4D	10,75	7,21	8,30	0,46
Cd/Zn4D	15,24	6,43	9,04	0,97
Cu/Zn4D	12,42	6,90	10,00	0,84
Controle8D 2	13,41	6,40	10,07	1,20
Cd/Cu8D	10,32	5,55	8,14	0,65
Cd/Zn8D	8,84	6,28	7,53	0,35
Cu/Zn8D	11,05	6,68	8,64	0,60
Controle12D 2	10,92	7,42	9,03	0,59
Cd/Cu12D	12,83	7,41	9,26	0,62
Cd/Zn12D	10,81	6,98	8,93	0,52
Cu/Zn12D	8,77	5,59	7,28	0,47
Referência 1	20,85	13,58	17,60	0,82
Referência 2	10,17	4,81	7,02	0,53

Tabela 19: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína-1) em fígado de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	15,50	6,70	11,39	1,01
Cd4D	15,90	7,58	11,89	1,10
Cu4D	15,84	7,00	11,35	1,00
Zn4D	13,62	7,19	10,54	0,94
Cd/Cu/Zn4D	16,56	7,93	10,93	1,14
Controle 8D	13,93	8,32	11,51	0,71
Cd8D	18,22	9,56	11,41	1,70
Cu8D	15,28	10,09	13,32	0,90
Zn8D	18,54	9,41	12,86	1,30
Cd/Cu/Zn8D	23,79	10,31	15,36	2,14
Controle 12D	23,51	8,77	13,82	1,58
Cd12D	24,09	8,97	14,98	2,64
Cu12D	18,56	9,16	13,26	1,87
Zn12D	16,05	6,06	10,49	1,17
Cd/Cu/Zn12D	12,28	6,03	7,98	0,81
Controle4D 2	10,17	6,43	7,51	0,49
Cd/Cu4D	9,50	5,59	7,05	0,53
Cd/Zn4D	7,05	5,53	6,32	0,19
Cu/Zn4D	13,76	4,42	8,02	1,04
Controle8D 2	9,41	6,27	7,36	0,39
Cd/Cu8D	14,31	6,26	9,63	1,42
Cd/Zn8D	8,97	5,00	6,68	0,51
Cu/Zn8D	8,70	6,00	6,80	0,35
Controle12D 2	11,51	6,54	9,25	0,84
Cd/Cu12D	13,09	5,35	7,65	0,86
Cd/Zn12D	9,18	4,82	6,91	0,51
Cu/Zn12D	9,93	4,78	8,17	0,73
Referência 1	9,53	6,31	8,27	0,38
Referência 2	11,61	5,36	7,00	0,70

Tabela 20: Atividade da GPx (U GPx . mg proteína-1) em rim de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

<i>Tratamento</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Média</i>	<i>± SEM</i>
Controle 4D	24,88	10,00	14,90	1,87
Cd4D	11,16	7,10	9,01	0,53
Cu4D	15,14	7,29	10,29	1,02
Zn4D	19,64	6,83	11,42	1,84
Cd/Cu/Zn4D	19,63	5,94	10,31	1,69
Controle 8D	8,01	5,66	7,09	0,31
Cd8D	9,23	5,25	7,18	0,64
Cu8D	11,39	6,48	8,74	0,97
Zn8D	8,18	5,17	7,03	0,38
Cd/Cu/Zn8D	10,15	4,95	8,60	0,65
Controle 12D	17,27	8,81	11,78	0,99
Cd12D	12,81	6,71	9,83	1,08
Cu12D	12,17	6,99	9,92	0,89
Zn12D	11,47	6,78	8,69	0,59
Cd/Cu/Zn12D	10,38	7,33	8,71	0,37
Controle4D 2	16,58	6,41	10,93	1,37
Cd/Cu4D	20,63	6,84	11,00	1,75
Cd/Zn4D	10,91	7,42	8,31	0,40
Cu/Zn4D	10,24	6,49	8,12	0,47
Controle8D 2	8,56	7,05	7,82	0,20
Cd/Cu8D	14,02	5,90	8,04	1,22
Cd/Zn8D	7,98	3,41	6,91	0,61
Cu/Zn8D	10,25	6,69	8,09	0,49
Controle12D 2	8,00	6,81	7,26	0,19
Cd/Cu12D	8,93	6,88	8,01	0,26
Cd/Zn12D	9,43	7,40	8,53	0,29
Cu/Zn12D	9,50	6,65	7,82	0,39
Referência 1	10,12	6,98	8,62	0,48
Referência 2	12,61	6,50	8,78	0,69

Tabela 21: Níveis de hidroperoxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em brânquias de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	0,26	0,14	0,18	0,01
Cd4D	0,30	0,15	0,20	0,02
Cu4D	0,15	0,04	0,10	0,01
Zn4D	0,18	0,09	0,14	0,01
Cd/Cu/Zn4D	0,15	0,03	0,10	0,01
Controle 8D	0,19	0,10	0,14	0,01
Cd8D	0,28	0,11	0,17	0,03
Cu8D	0,16	0,11	0,13	0,01
Zn8D	0,17	0,10	0,13	0,01
Cd/Cu/Zn8D	0,20	0,10	0,15	0,01
Controle 12D	0,17	0,11	0,13	0,01
Cd12D	0,19	0,10	0,14	0,01
Cu12D	0,14	0,10	0,12	0,01
Zn12D	0,16	0,07	0,11	0,01
Cd/Cu/Zn12D	0,13	0,08	0,10	0,01
Controle4D 2	1,19	0,15	0,33	0,16
Cd/Cu4D	0,16	0,10	0,12	0,01
Cd/Zn4D	0,16	0,09	0,11	0,01
Cu/Zn4D	0,26	0,10	0,17	0,02
Controle8D 2	0,17	0,07	0,11	0,01
Cd/Cu8D	0,12	0,08	0,09	0,01
Cd/Zn8D	0,19	0,07	0,10	0,02
Cu/Zn8D	0,16	0,09	0,12	0,01
Controle12D 2	0,19	0,10	0,14	0,02
Cd/Cu12D	0,19	0,10	0,12	0,01
Cd/Zn12D	0,19	0,08	0,11	0,01
Cu/Zn12D	0,11	0,07	0,08	0,00
Referência 1	0,16	0,01	0,10	0,02
Referência 2	0,16	0,08	0,12	0,01

Tabela 22: Níveis de hidroxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em fígado de *O. niloticus* exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	1,21	0,02	0,34	0,14
Cd4D	1,23	0,02	0,26	0,17
Cu4D	1,30	0,07	0,64	0,15
Zn4D	1,00	0,02	0,39	0,15
Cd/Cu/Zn4D	1,50	-0,01	0,76	0,24
Controle 8D	0,37	0,14	0,26	0,03
Cd8D	0,25	-0,01	0,16	0,05
Cu8D	0,76	0,05	0,34	0,14
Zn8D	1,18	-0,01	0,34	0,16
Cd/Cu/Zn8D	1,50	-0,01	0,59	0,21
Controle 12D	0,64	-0,01	0,31	0,08
Cd12D	0,56	-0,01	0,13	0,11
Cu12D	0,62	0,01	0,29	0,12
Zn12D	0,43	-0,01	0,12	0,06
Cd/Cu/Zn12D	1,15	0,17	0,60	0,13
Controle4D 2	0,25	0,00	0,11	0,03
Cd/Cu4D	0,28	-0,01	0,13	0,04
Cd/Zn4D	0,27	0,01	0,12	0,04
Cu/Zn4D	0,23	0,01	0,10	0,03
Controle8D 2	0,25	0,06	0,14	0,03
Cd/Cu8D	0,26	0,03	0,12	0,04
Cd/Zn8D	0,33	0,00	0,12	0,04
Cu/Zn8D	0,32	0,00	0,16	0,04
Controle12D 2	0,45	0,13	0,21	0,05
Cd/Cu12D	0,37	0,00	0,16	0,04
Cd/Zn12D	0,28	0,00	0,15	0,03
Cu/Zn12D	0,32	0,04	0,13	0,04
Referência 1	1,05	0,10	0,49	0,11
Referência 2	0,37	0,00	0,22	0,05

Tabela 23: Níveis de hidroperoxidação (HP) em nmol HP . mg proteína-1, em rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	5,33	1,68	3,19	0,41
Cd4D	2,64	1,91	2,28	0,11
Cu4D	3,36	2,13	2,62	0,16
Zn4D	3,85	1,96	2,97	0,31
Cd/Cu/Zn4D	4,63	1,81	2,69	0,36
Controle 8D	3,02	2,05	2,38	0,11
Cd8D	2,55	2,14	2,36	0,07
Cu8D	3,43	1,98	2,53	0,26
Zn8D	2,53	1,76	2,28	0,11
Cd/Cu/Zn8D	3,13	1,48	2,64	0,21
Controle 12D	5,26	1,57	3,37	0,40
Cd12D	3,56	2,23	2,94	0,25
Cu12D	3,95	1,41	2,91	0,44
Zn12D	3,34	1,71	2,45	0,19
Cd/Cu/Zn12D	2,79	2,09	2,47	0,10
Controle4D 2	2,78	1,08	1,83	0,23
Cd/Cu4D	3,62	1,18	1,91	0,31
Cd/Zn4D	1,85	1,28	1,45	0,06
Cu/Zn4D	1,76	1,13	1,39	0,08
Controle8D 2	1,49	1,20	1,38	0,04
Cd/Cu8D	2,30	1,00	1,35	0,19
Cd/Zn8D	1,40	0,57	1,19	0,11
Cu/Zn8D	1,75	1,13	1,40	0,08
Controle12D 2	1,34	1,17	1,25	0,03
Cd/Cu12D	1,53	1,18	1,38	0,04
Cd/Zn12D	1,62	1,26	1,46	0,04
Cu/Zn12D	1,67	1,17	1,36	0,07
Referência 1	3,76	1,91	2,54	0,20
Referência 2	1,60	0,89	1,24	0,09

Tabela 24: Níveis de glutathione S-transferase (GST) em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$, em br\u00e2nquias de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combina\u00e7\u00f5es.

Tratamento	M\u00e1ximo	M\u00ednimo	M\u00e9dia	\pm SEM
Controle 4D	55,40	16,78	29,36	4,37
Cd4D	41,49	15,03	27,00	4,13
Cu4D	20,68	11,67	14,92	1,27
Zn4D	32,92	10,38	20,56	3,50
Cd/Cu/Zn4D	31,80	11,01	15,97	2,89
Controle 8D	35,04	15,87	22,76	2,64
Cd8D	38,57	14,66	27,58	4,65
Cu8D	33,35	12,55	22,92	4,39
Zn8D	41,05	11,94	21,69	3,84
Cd/Cu/Zn8D	45,20	9,87	21,97	5,08
Controle 12D	31,70	12,93	19,27	2,27
Cd12D	38,11	7,40	21,62	5,85
Cu12D	22,14	7,94	14,07	2,63
Zn12D	14,78	8,96	11,81	0,74
Cd/Cu/Zn12D	21,78	9,86	15,12	1,43
Controle4D 2	51,13	15,28	29,48	5,55
Cd/Cu4D	88,20	16,69	38,62	9,15
Cd/Zn4D	26,31	10,64	18,86	1,87
Cu/Zn4D	54,87	7,40	28,99	5,63
Controle8D 2	17,70	10,39	14,31	1,06
Cd/Cu8D	42,62	18,80	32,02	3,38
Cd/Zn8D	70,16	8,62	28,44	8,14
Cu/Zn8D	31,58	13,35	23,11	2,70
Controle12D 2	76,63	21,45	37,95	8,32
Cd/Cu12D	67,89	13,48	29,39	6,17
Cd/Zn12D	37,57	13,84	26,46	3,04
Cu/Zn12D	49,34	15,35	23,95	4,42
Refer\u00eancia 1	22,71	9,09	17,78	1,84
Refer\u00eancia 2	20,54	12,13	15,83	0,98

Tabela 25: Níveis de glutathiona S-transferase (GST) em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹, em fígado de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	78,63	36,49	59,13	6,04
Cd4D	98,88	3,95	49,74	10,89
Cu4D	97,88	34,35	73,15	8,09
Zn4D	79,10	46,63	61,29	4,26
Cd/Cu/Zn4D	97,81	41,69	60,84	6,60
Controle 8D	96,58	16,07	55,16	9,01
Cd8D	65,98	37,71	50,14	4,81
Cu8D	105,47	59,49	79,68	9,10
Zn8D	88,14	57,20	69,35	4,75
Cd/Cu/Zn8D	140,43	22,49	70,50	15,03
Controle 12D	103,54	34,91	70,73	8,69
Cd12D	90,62	52,88	65,14	6,77
Cu12D	105,28	44,71	66,21	11,45
Zn12D	64,43	27,51	39,90	3,95
Cd/Cu/Zn12D	70,32	29,18	51,69	5,87
Controle4D 2	120,43	19,40	59,97	17,27
Cd/Cu4D	87,37	20,08	56,62	9,47
Cd/Zn4D	82,12	31,96	61,46	6,28
Cu/Zn4D	91,44	3,95	39,35	8,36
Controle8D 2	163,27	33,37	88,36	18,49
Cd/Cu8D	109,15	23,69	55,88	14,29
Cd/Zn8D	91,23	9,14	52,25	10,82
Cu/Zn8D	72,59	19,74	39,92	7,26
Controle12D 2	100,06	18,05	46,89	12,24
Cd/Cu12D	54,81	11,10	23,57	5,56
Cd/Zn12D	94,40	15,28	48,60	11,79
Cu/Zn12D	75,49	8,07	30,09	10,01
Referência 1	69,68	39,23	56,65	3,61
Referência 2	163,33	16,13	83,45	17,92

Tabela 26: Níveis de glutathiona S-transferase (GST) em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹, em rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	± SEM
Controle 4D	50,57	6,96	19,22	4,96
Cd4D	12,10	5,45	8,39	1,03
Cu4D	16,85	6,83	10,80	1,17
Zn4D	29,54	5,18	15,00	3,64
Cd/Cu/Zn4D	40,31	3,12	11,21	4,99
Controle 8D	10,58	5,49	7,22	0,68
Cd8D	8,00	4,65	6,78	0,61
Cu8D	15,67	3,52	9,18	1,94
Zn8D	19,17	5,27	10,01	1,74
Cd/Cu/Zn8D	17,91	4,59	11,75	1,70
Controle 12D	39,79	4,79	18,60	4,80
Cd12D	38,18	5,71	16,98	6,21
Cu12D	27,48	4,12	15,14	4,04
Zn12D	25,57	2,36	10,31	2,45
Cd/Cu/Zn12D	16,83	4,72	10,68	1,66
Controle4D 2	24,46	5,25	13,38	2,67
Cd/Cu4D	36,06	7,55	14,86	3,75
Cd/Zn4D	15,52	3,31	8,72	1,34
Cu/Zn4D	11,91	2,36	7,04	0,93
Controle8D 2	10,41	4,87	7,32	0,79
Cd/Cu8D	18,04	5,71	8,79	1,91
Cd/Zn8D	9,06	1,49	6,42	1,09
Cu/Zn8D	16,73	6,60	9,63	1,51
Controle12D 2	11,73	4,92	7,95	0,98
Cd/Cu12D	17,47	4,29	10,77	1,30
Cd/Zn12D	12,52	6,07	9,03	0,72
Cu/Zn12D	8,94	6,26	7,98	0,34
Referência 1	13,21	7,51	10,21	0,64
Referência 2	13,32	6,68	10,91	0,89

Tabela 27: Níveis de metalotioneína (MT) em $\mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$, em brânquias de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	\pm SEM
Controle 4D	775,27	417,12	543,00	37,30
Cd4D	688,86	324,48	490,57	50,20
Cu4D	666,83	251,03	419,31	42,65
Zn4D	834,54	208,45	512,30	85,03
Cd/Cu/Zn4D	399,64	195,08	292,77	29,43
Controle 8D	852,24	249,52	488,16	72,02
Cd8D	889,61	247,27	607,38	112,05
Cu8D	1178,27	348,76	836,09	137,92
Zn8D	1074,12	386,23	601,76	90,01
Cd/Cu/Zn8D	1129,64	424,55	786,44	104,30
Controle 12D	1084,76	313,51	619,85	86,34
Cd12D	816,17	247,37	631,25	100,20
Cu12D	520,44	128,51	388,06	68,20
Zn12D	1190,90	348,70	803,09	107,10
Cd/Cu/Zn12D	1626,74	793,11	1012,87	108,36
Controle4D 2	759,26	314,41	523,81	64,54
Cd/Cu4D	718,66	315,82	565,16	52,86
Cd/Zn4D	855,94	394,30	565,85	55,70
Cu/Zn4D	629,89	139,82	425,78	61,11
Controle8D 2	425,83	194,13	350,05	34,91
Cd/Cu8D	506,21	292,01	382,44	35,75
Cd/Zn8D	640,16	311,44	416,07	41,66
Cu/Zn8D	708,13	414,91	552,25	41,81
Controle12D 2	733,63	491,44	626,39	40,04
Cd/Cu12D	729,82	463,88	583,64	27,78
Cd/Zn12D	693,44	283,83	470,12	50,72
Cu/Zn12D	627,63	375,61	474,13	32,53
Referência 1	575,99	226,65	393,44	47,88
Referência 2	845,87	215,66	635,74	71,13

Tabela 28: Níveis de metalotioneína (MT) em $\mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$, em fígado de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

<i>Tratamento</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Média</i>	\pm <i>SEM</i>
Controle 4D	831,58	254,96	488,33	75,38
Cd4D	579,05	196,68	436,71	55,56
Cu4D	398,06	181,34	275,23	31,18
Zn4D	1202,93	292,82	565,15	132,26
Cd/Cu/Zn4D	628,51	209,71	431,02	64,76
Controle 8D	642,87	209,19	357,49	54,09
Cd8D	724,15	301,89	612,10	78,93
Cu8D	765,84	201,56	481,00	118,33
Zn8D	872,52	258,51	648,77	79,07
Cd/Cu/Zn8D	849,31	153,82	468,85	111,67
Controle 12D	881,66	304,59	532,31	67,76
Cd12D	1069,82	611,18	779,57	78,79
Cu12D	763,71	203,25	444,09	122,31
Zn12D	660,58	149,30	474,12	66,06
Cd/Cu/Zn12D	530,65	106,84	267,80	64,21
Controle4D 2	728,93	169,03	556,21	86,24
Cd/Cu4D	1134,72	445,08	777,16	96,08
Cd/Zn4D	948,75	533,07	696,72	47,83
Cu/Zn4D	916,67	176,73	488,84	99,01
Controle8D 2	1210,98	483,31	824,31	108,03
Cd/Cu8D	701,44	95,59	470,25	84,51
Cd/Zn8D	1091,56	253,45	759,20	124,64
Cu/Zn8D	1029,96	377,83	779,67	91,67
Controle12D 2	838,19	260,15	605,30	110,92
Cd/Cu12D	788,07	269,91	528,13	63,60
Cd/Zn12D	1004,77	541,18	842,20	67,81
Cu/Zn12D	924,69	487,75	651,28	56,80
Referência 1	678,29	97,96	425,81	75,22
Referência 2	701,21	137,62	450,60	66,73

Tabela 29: Níveis de metalotioneína (MT) em $\mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$, em rim de *O. niloticus*, exposta por 12 dias aos metais Cd, Cu e Zn e suas combinações.

Tratamento	Máximo	Mínimo	Média	\pm SEM
Controle 4D	1184,14	917,37	1023,77	61,50
Cd4D	937,31	658,06	811,08	59,91
Cu4D	891,11	758,94	802,54	30,81
Zn4D	1546,70	1014,70	1259,27	117,20
Cd/Cu/Zn4D	1426,39	846,92	1105,06	121,30
Controle 8D	985,64	522,14	762,12	80,24
Cd8D	1479,71	760,56	990,01	167,01
Cu8D	1475,35	1004,80	1252,22	108,16
Zn8D	2189,32	1092,60	1574,86	204,02
Cd/Cu/Zn8D	994,36	722,39	859,54	48,18
Controle 12D	1451,59	602,76	901,25	127,87
Cd12D	852,57	297,58	595,51	91,82
Cu12D	729,51	521,63	623,77	33,89
Zn12D	966,56	471,15	697,79	68,01
Cd/Cu/Zn12D	888,36	589,43	670,85	55,20
Controle4D 2	2229,05	786,04	1596,28	170,76
Cd/Cu4D	2088,37	959,00	1511,44	182,29
Cd/Zn4D	1851,80	825,45	1173,21	142,27
Cu/Zn4D	1831,01	671,54	1019,18	138,69
Controle8D 2	1335,66	688,59	872,99	83,85
Cd/Cu8D	1184,29	492,75	879,26	116,95
Cd/Zn8D	1527,31	703,36	1198,13	109,34
Cu/Zn8D	1302,65	577,69	905,01	94,56
Controle12D 2	1516,95	1085,04	1310,35	56,67
Cd/Cu12D	1170,89	476,95	705,43	78,54
Cd/Zn12D	1115,75	404,23	717,07	97,75
Cu/Zn12D	719,89	233,71	516,98	67,15
Referência 1	691,07	556,04	625,19	27,64
Referência 2	1852,15	578,35	1356,26	168,39

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)