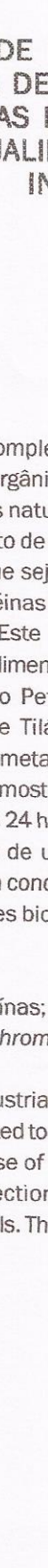


UTILIZAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS COMO
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO POR METAIS
TRAÇOS EM BACIAS DE RETENÇÃO DE EFLUENTES:
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HÍDRICA PARA O REÚSO
INDUSTRIAL


IGOR LEONARDO PEREIRA RODRIGUES
IRACEMA ANDRADE NASCIMENTO
MAURO DE FREITAS REBELO
RODRIGO CUNHA WANICK



Resumo: As atividades nos complexos industriais, geradoras de resíduos tóxicos, através das suas correntes inorgânicas que são direcionadas a bacias de contenção, podem atingir corpos hídricos naturais e gerar impactos. O uso de biomarcadores de exposição no embasamento de ações de controle e risco permite a detecção de impactos deletérios antes que sejam manifestados em níveis de populações ou comunidades. As metalotioneínas são biomarcadores que indicam a presença de metais traços no ambiente. Este trabalho visou avaliar a biodisponibilidade de metais traços na água e no sedimento de diferentes pontos das Bacias de Contenção do Complexo Básico do pólo Petroquímico de Camaçari-BA, utilizando como organismos-testes juvenis de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), para a comprovação da indução de metalotioneínas. As tilápias foram expostas à água proveniente de cinco pontos amostrais de duas bacias de contenção, bem como ao sedimento, por um período de 24 horas. Foram utilizadas cinco réplicas, para cada ponto de amostragem, além de um ponto controle. Os resultados indicaram a presença de metais traços em concentrações expressivas, em relação ao controle, salientando a eficiência destes biomarcadores na avaliação da qualidade hídrica para o reuso industrial.

Palavras-chave: Metalotioneínas; Biodisponibilidade; Metais-traços; Bacias de Retenção de Efluentes; *Oreochromis niloticus*; Avaliação de Corpos Hídricos.

Abstract: The activities in industrial complexes, that generate toxic waste through inorganic chains that are directed to retention basins, can reach natural water bodies and generate impacts. The use of exposition biomarkers in the basement of risk assessment allows the detection of deleterious impacts before revealed in populations or community levels. The metallothioneins are biomarkers that evidence



the presence of trace metals in the environment. This research aimed to evaluate the bioavailability of these contaminants in the water and in the sediment in different points of the Basic Complex contention basin of the Petrochemical Industrial region of Camaçari-Ba by using juveniles of Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) as test organisms for the evidence of the induction of metallothioneins. The fishes had been exposed to the water collected from 5 points from 2 retention basins, as well as to the sediment, for a 24-hour period and in 5 replicates, for each sampling point, beyond a control point. The results had indicated the presence of trace metals in expressive concentrations, compared to the control, pointing out the efficiency of this biomarker for the evaluation of hidric quality for industrial reuse.

Key-words: Metallothioneins, bioavailability, trace metals, effluent retention basin, *Oreochromis niloticus*, water body assessment.

1 INTRODUÇÃO

O uso de biomarcadores é considerado uma ferramenta promissora para detecção prévia de efeitos adversos de poluentes em organismos (DEPLEDGE, 1994; NASCIMENTO ET AL., 1998B APUD L.K.P MARTINS ET AL., 2005). O efeito primário da ação destas substâncias compreende as perturbações dos processos bioquímicos e moleculares no interior das células, podendo alterar, desta forma, as funções vitais dos organismos expostos (BAYNE ET AL., 1988). Essas alterações também podem ser detectadas em níveis subcelulares, sendo consideradas como *early warning markers*.

As metalotioneínas são proteínas citosólicas, de baixo peso molecular, ricas em cisteína que se ligam a metais, e cujo aumento de indução resulta de uma resposta específica de exposição a metais como o cobre, zinco, cádmio e mercúrio (ENGEL; ROESIADI, 1987; VIARENGO, 1989; VIARENGO ET AL., 1996). O uso destes biomarcadores no monitoramento de poluição por metais traços evidencia as metalotioneínas como indicadoras de concentrações sub-letais de uma determinada mistura de íons metálicos, conseqüentemente, indicando a relevância biológica da presença destes poluentes em corpos de água (CHAN, 1995). Estudos recentes relacionam o mecanismo de regulação indutiva da expressão das metalotioneínas pelos metais e suas interações com moléculas-alvo e fornecem informações importantes da significância toxicológica da indução destes biomarcadores por metais traços (ROESIADI, 1996).

Atualmente, o setor industrial busca implementar metodologias mais eco-compatíveis em seus processos produtivos, objetivando minimizar os impactos

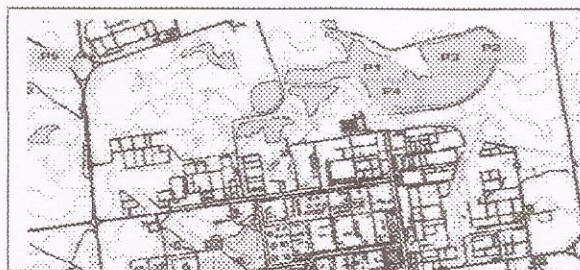
proporcionados ao meio ambiente. O reuso da água de bacias de contenção de efluentes industriais "inorgânicos" (não resultantes diretamente dos processos produtivos) para diluição de efluentes gerados diretamente dos processos, pode ser uma alternativa viável, mas depende de análises ecotoxicológicas para avaliação de sua qualidade. Esses resíduos podem, eventualmente, conter substâncias tóxicas geradas pela atividade industrial petroquímica, principalmente metais traços.

A área de estudo, o Pólo Petroquímico de Camaçari, compreende uma região de intensa atividade petroquímica situado na região metropolitana de Salvador, a cerca de 56 km da capital do Estado da Bahia, sendo composto por diversas indústrias do ramo petrolífero, que iniciaram sua operação na década de 1970, e vêm operando e aumentando, desde então, a sua produção (FRIST ET AL.,1991). As Bacias do Complexo Básico, objetos de estudo para o reuso de água, vem recebendo efluentes do sistema não-orgânico há vários anos (lavagem de pátios, água de chuva, etc) que podem estar carreando poluentes prioritários, de longa meia vida. O trabalho teve como objetivo analisar o grau de toxicidade da água e do sedimento da Bacia de Contenção do Complexo Básico no Pólo Petroquímico de Camaçari - BA, através da avaliação da biodisponibilidade de metais na água e no sedimento superficial, utilizando Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) como organismo- teste.

2 MATERIAL E MÉTODOS: OBTENÇÃO DOS ORGANISMOS-TESTE E PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM:

Os organismos utilizados nos ensaios (juvenis de Tilápia do Nilo) foram obtidos através do Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS), onde são criados sob condições controladas. As coletas foram realizadas em 4 campanhas amostrais (Abril, Maio, Junho e Dezembro de 2006).

A área amostral foi dividida em cinco locações (P1 a P5) sendo que os pontos P1 a P4 (pontos localizados na Bacia de Contenção de Efluentes 1) e o P5 localiza-se no interior da Bacia Contenção de Efluentes 2). . O georeferenciamento destes pontos foi realizado com o GPS TRIMBLE GEOEXPLORER 3 e as coordenadas são expressas em UTM -Projeção Universal Transversal de Mercator.



P1 - Borda oeste da Bacia de
Contenção 1
(X:574.368.43/Y:8.601.863.59)
P2 - Borda leste da Bacia de
Contenção 1
(X:575.036.78/Y:8.602.061.69)
P3 - Parte profunda da Bacia de
Contenção 1
(X:574.839.77/Y: 8.602.131.93)
P4 - Interior da Bacia de
Contenção 1
(X:574.396.94/ Y:8.601.735.88)
P5 - Bacia de Contenção 2
(X:569.472.52/Y:8.602.585.15)

Figura 1 - Distribuição dos pontos de amostragem

Foram coletadas amostras líquidas (efluente) e de sedimento em todos os pontos de amostragem, usando-se Garrafa de Van Dorn (Kramer et al., 1994) e draga de Pettersen (BOYD, 1995), respectivamente. As amostras coletadas foram levadas ao LABIOMAR, onde o trabalho experimental foi realizado obedecendo a protocolos de testes existentes no laboratório (CETESB, 1990a; CETESB, 1990b; NASCIMENTO, 2000; NASCIMENTO, 2002).

2.1 Exposição dos organismos às amostras ambientais:

Os animais foram selecionados, com base no tamanho (9 - 13 cm) e peso (30 a 40 g). Esta seleção dá uma ideia aproximada da idade (fase juvenil) e maturidade dos animais. As tilápias foram expostas à água proveniente de diversos pontos das bacias de contenção, bem como ao sedimento, por um período de 24 horas, e com cinco réplicas, para cada ponto de amostragem, além de um ponto controle. Cada aquário (capacidade de 10L) continha 4L de água (amostra) e um exemplar juvenil de tilápia. As amostras de sedimento foram dispostas em aquários sob as mesmas condições, com 300g de sedimento/aquário, perfazendo uma camada de 1,5cm coberta por 4L de água de diluição, cuja qualidade foi previamente analisada no laboratório.

2.3 Determinação da indução de Metalotioneínas:

Após a exposição, os peixes foram sacrificados e a sua biometria e sexagem foram realizadas. Para cada peixe, o fígado foi extraído, lavado com solução de KCl 0,150M para a remoção de resíduos sanguíneos, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. Foram utilizados *pools* de fígados obtidos pelas réplicas de cada ponto de amostragem. Para a obtenção do homogeneizado, foi utilizado 0,5g do tecido dos *pools*, embebidos em 1,5mL da solução A+B (solução A: tampão para extração de tecido / solução B: inibidora de proteases), suplementada com o 2-mercaptoetanol (agente anti-oxidante), e de um

homogeneizador Janke & Kunkel modelo RW20 em condições de refrigeração adequadas. Alíquotas de 2mL foram transferidas para microtubos Eppendorfs®, previamente identificados e centrifugados a 20.000G por 40 minutos.

A detecção de metalotioneínas foi realizada pela técnica de Viarengo et al, 1997 adaptada para a utilização do Kit MT PAGE TISSUE® produzido pela IKZUS ENVIRONMENT- Itália, aliada a um ensaio eletroforético por luminescência, realizado no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A quantificação relativa das metalotioneínas foi realizada por densitometria das bandas através do uso do programa IMAGE J (disponível para download em www.rsbl.info.nih.gov/ij/), que mede o número e a intensidade dos píxeis da área das bandas formadas nas fotos digitalizadas dos géis SDS-PAGE. Realizou-se o cálculo para a determinação dos valores reais de fluorescência das bandas formadas (obtido pela diferença das áreas das bandas formadas e de seus respectivos "background"). Para a obtenção das concentrações totais de metalotioneínas ($\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$) nas amostras foi realizado um cálculo de regressão (determinação da curva padrão de cada gel com suas respectivas equações da reta e coeficientes de correlação)

Equação do cálculo	Coefficiente de correlação	Gel
$y = 71250x + 3256,7$	$R^2 = 0,9866$	1.
$y = 119763x + 5274,7$	$R^2 = 0,9168$	2.
$y = 67764x + 3033,3$	$R^2 = 0,9984$	3.
$y = 144006x + 5183$	$R^2 = 0,9824$	4.
$y = 127998x + 12288$	$R^2 = 0,972$	5.
$y = 220930x + 9987,9$	$R^2 = 0,9984$	6.
$y = 143217x - 11990$	$R^2 = 0,9978$	7.
$y = 125408x + 4641,9$	$R^2 = 0,9999$	8.

Utilizando como exemplo a equação $Y = 71250x + 3256,7$, temos:

- X = nº de píxeis da banda de MT (calculado no IMAGE J);
- Y = Proteína (**Metalotioneína em $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$**)

Parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido foram determinados através de aparelho multiparâmetro (marca Multiline, modelo P4/F SET-3). Os níveis de nitrato, amônia e dureza da água (APHA, 1995), além da determinação de carbono orgânico por calcinação (LUCZAK ET AL., 1997) e da granulometria (EMBRAPA, 1997) foram determinadas para garantir que os resultados obtidos nos mesmos refletissem a ação tóxica dos poluentes e não uma provável variação desses parâmetros. Todas as amostras ambientais líquidas e de

sedimento foram submetidas à determinação da concentração de metais traços por espectrofotometria de absorção atômica através do Método MESP 110 - ASTM D5258/02 no Laboratório de Espectroscopia do Centro de Tecnologia Industrial Pedro Ribeiro - CETIND (Salvador - Bahia). Foi realizada, concomitantemente aos ensaios, a determinação de proteínas totais em todas as amostras de fígado dos peixes pela metodologia de Bradford (1976) por espectrofotometria.

2.3 Tratamento estatístico

As ferramentas estatísticas utilizadas para relacionar a indução de metalotioneínas com as concentrações de metais-traço nas amostras ambientais foram análise multivariada e análise de correspondência múltipla (MCA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 Parâmetros físico-químicos

Durante todos os testes realizados, os parâmetros ambientais controlados nos aquários (Temperatura (T°), pH, Salinidade (S‰), Oxigênio Dissolvido (OD), Nitrito (N-NO₂), Nitrito (N-NH₃), carbono orgânico, dureza e granulometria do sedimento) raramente atingiram ou ultrapassaram os padrões estabelecidos (CONAMA 357/2005); conseqüentemente, considera-se que não tenham interferido nos resultados das determinações ecotoxicológicas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Valores de parâmetros físico-químicos nas amostras líquidas e valores limites estabelecidos pela CONAMA 357/2005.

Campanha	Parâmetro	Limite	Controle	P1	P2	P3	P4	P5
1	O.D mg/L	> 4	8,3	7,2	7,5	8,0	6,6	8,0
	pH	< 8,5	7,3	7,2	6,9	7,1	7,3	7,5
	T C°	>27-30	26	27	26	26	26	26
	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	0	0	1	0	1	0
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,4	0,2
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0,0	0,0	0	0,1	0,3	0,1
	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-duras					
	O.D mg/L	> 4	8,0	7,6	7,4	7,0	6,5	7,1
	pH	< 8,5	7,0	6,0	6,8	7,1	7,1	6,4
	T C°	>27-30	25	25	25	25	25	25
2	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	0	0	0	0	0	0
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	2,1	2,2	2,1	2,0	1,8	1,8
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0,0	0,2	1,6	1,7	0,5	0,0
	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-duras					
	O.D mg/L	> 4	7,0	8,0	7,7	7,6	7,7	7,8
	pH	< 8,5	6,1	6,0	7,0	6,9	6,3	6,3
	T C°	>27-30	25	25	25	25	25	25
	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	0	1	1	1	1	0
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	1,5	2,0	1,8	0,9	1,3	1,2
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0,1	0,8	2,2	2,3	1,5	0,1
3	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-duras					

Tabela 2. Valores de parâmetros físico-químicos nas amostras de sedimento e valores limites estabelecidos pela CONAMA 344/2004.

Campanha	Parâmetro	Limite	Controle	P1	P2	P3	P4	P5	
1	O.D mg/L	> 4	8,2	7,8	6,5	6,6	7,0	7,4	
	pH (laboratório)	< 8-8,5	6,8	7,1	8,0	7,6	7,1	6,8	
	T C°	>27-30	27	27	27	26	27	27	
	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	1	0	0	1	1	0	
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	0,7	0,4	0,1	0,6	0,2	1,0	
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,6	0,2	
	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-dura						
	O.D mg/L	> 4	8,0	7,7	7,7	7,1	7,2	7,8	
2	pH (laboratório)	< 8-8,5	6,7	6,5	7,1	7,1	6,6	6,7	
	T C°	>27-30	26	26	27	27	27	27	
	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	1	1	0	0	0	0	
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	2,7	2,2	2,4	2,5	2,2	1,4	
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0	0,5	0,2	0,1	0,1	0	
	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-dura						
	O.D mg/L	> 4	8,0	7,6	7,8	7,7	7,8	7,2	
	pH (laboratório)	< 8-8,5	6,4	5,7	7,2	7	6,4	6,4	
3	T C°	>27-30	25	25	25	25	25	25	
	Salinidade (ppt)	<0,5 - 1	0	1	1	0	1	0	
	Amônia mg/N-NH ₃ /L	<0,45-2	2,2	2,0	1,6	2,0	1,7	1,8	
	Nitrito mg N - NO ₂ /L	<1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	
	Dureza da água (ppm)	<300	Semi-dura						

3.2 Eletroforese em gel Tris/Tricina SDS-PAGE (amostras líquidas e de sedimento)

Os "pellets" das amostras de fígado de *O. niloticus*, obtidos de animais do grupo controle (expostos a amostras de áreas não impactadas) e dos grupos expostos as amostras líquidas e de sedimento das bacias de contenção de efluentes petroquímicos, foram submetidos à eletroforese em gradiente SDS - PAGE, com o objetivo de detectar o perfil de indução de metalotioneínas nestes diferentes tratamentos de exposição.

Através da análise do perfil eletroforético dos géis, foram evidenciados diferentes picos de indução de metalotioneínas, constatados pelos diferentes níveis de intensidade da fluorescência das bandas formadas. Este fato está relacionado com as diferentes concentrações e tipos de metais-traços presentes nas amostras testadas das diferentes alocações amostrais.

3.3 Indução de metalotioneínas em fígado de *O. niloticus* expostos as amostras líquidas:

A partir da execução das análises, foram evidenciados diferentes níveis de indução de metalotioneínas nos diversos pontos de amostragem das bacias de contenção. As análises químicas realizadas nas amostras de água superficial revelaram a presença de metais traços essenciais e não essenciais como: Mercúrio, Zinco, Chumbo, Cromo, Ferro, Manganês e Alumínio. As respostas biológicas encontradas

nos ensaios indicativas de toxicidade fundamentaram-se, principalmente, nas concentrações de metais traços não essenciais (Hg, Pb e Cd) presentes nas amostras analisadas.

Dentre os pontos amostrados na bacia de contenção de efluentes 1, as estações P1 e P2 (Figura 2) apresentaram os maiores níveis de indução de metalotioneínas. É importante salientar que estes pontos amostrais estão localizados nas margens da bacia receptora de efluentes um, onde o processo de revolvimento do sedimento pode explicar os altos índices de indução de MT nestas estações, por conta da translocação das espécies químicas metálicas para a coluna d'água. Os demais pontos analisados neste mesmo corpo hídrico receptor não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle (área não impactada).

A bacia receptora de efluentes 2 apresentou um baixo índice de indução de metalotioneínas, que pode ser explicado pelas altas concentrações de cobre detectadas neste local, que inibiram a indução deste biomarcador (0,156 µg/L, 0,16 µg/L e 0,19 µg/L, respectivamente).

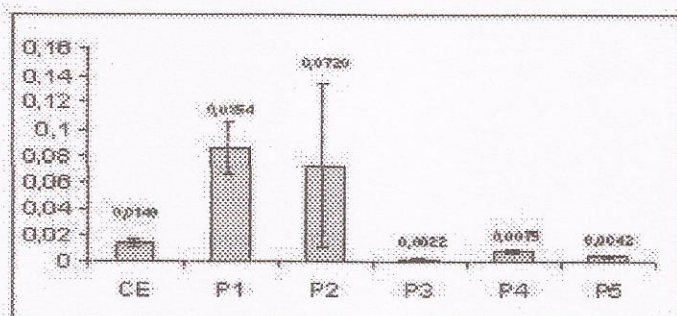


Figura 2. Resultados de MT ($\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$)/PTN total (mg.mL) em fígado de *O. niloticus* expostos à água das bacias de contenção.

Em algumas estações, foi constatada uma maior magnitude de resposta biológica utilizando a indução das metalotioneínas em fígados de peixes expostos as amostras de água e sedimento. Para avaliar a relação destes dados com tantos valores baixos e não-detectáveis, os resultados foram categorizados e uma análise de correspondência múltipla foi realizada. A categorização tentou dividir os valores das concentrações em 3 categorias: ND, valores não detectáveis ou perto do limite de detecção; valores baixo-médio e altos, essas duas últimas ordens de grandeza são superiores às outras.

o fato de que espécies metálicas solúveis são fatores importantes para a

indução de metalotioneínas. Ambos os eixos parecem ser influenciados pela presença de cobre. Em relação ao primeiro eixo (explicando 27% dos resultados), as amostras que apresentaram as maiores concentrações de cobre estão situadas à direita. Todas elas pertencem ao P5, que corresponderam perfeitamente com as concentrações de cobre superiores a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (categoria 20). As amostras que não apresentaram concentrações detectáveis deste metal estão na porção inferior do segundo eixo (17%), influenciando a separação das estações P1-P4. Valores intermediários (MT: 5) e elevados (MT: 20) de indução de metalotioneína foram observados no P2, aliados as maiores concentrações de Zn e especialmente Hg, um forte indutor de MT.

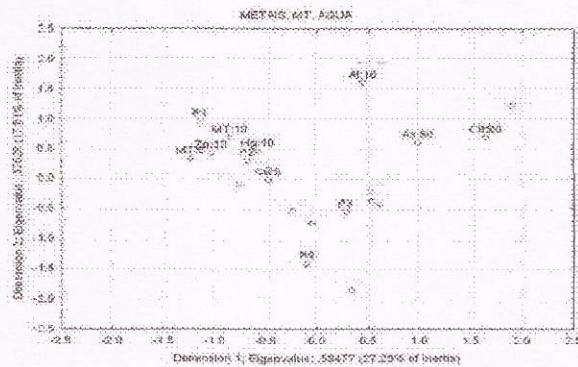


Figura 3. Análise de correspondência múltipla entre concentração de metais nas amostras líquidas e a indução de metalotioneínas no fígado de *O. niloticus* expostos à referida matriz amostral.

3.4 Indução de metalotioneínas em fígado de *O. niloticus* expostos as amostras de sedimento:

Com relação às análises do sedimento, os resultados obtidos pela medida de indução de metalotioneínas (**Figura 4**) também constataram diferentes padrões de indução para este biomarcador. Destacam-se os níveis de indução de metalotioneínas no ponto dois (o mais tóxico). O ponto cinco, por ser um corpo receptor de efluentes ricos em cobre, também apresentou níveis significativos de indução de metalotioneínas. Os demais pontos amostrados, apesar de evidenciarem a indução deste biomarcador, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. As concentrações de metais detectadas nas amostras de sedimento embasam as respostas biológicas (indução de metalotioneínas) encontradas nos testes.

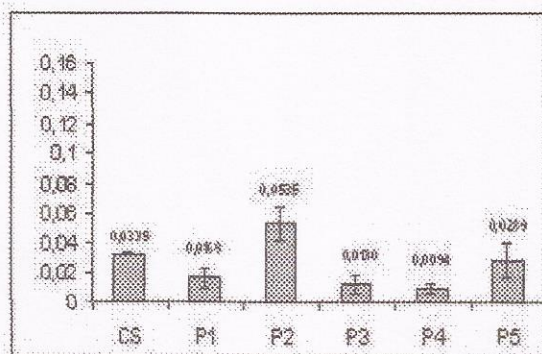


Figura 4. Resultados de MT ($\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$)/PTN total (mg.mL) em fígado de *O. niloticus* expostos ao sedimento das bacia de contenção.

Para os metais no sedimento, apenas o Cr, Ni, Zn, Cd, Cu apresentaram concentrações expressivas. A Figura 5 mostra a MCA para a concentração de metais no sedimento e indução de metalotioneínas em fígado de peixes expostos aos sedimentos das bacias de contenção. O primeiro eixo (26% potencial explicativo), foi caracterizado pela presença de diferentes metais, com Cd empurrando o eixo para a direita. A concentração de Cu foi o principal fator a contribuir para o segundo eixo (18%), com maiores concentrações na extremidade inferior. Pequenas concentrações de metal (não detectável - ND ou abaixo do limite de detecção) estavam concentradas na origem dos dois eixos, indicando baixo potencial para a distinção das estações, levando-se em consideração as concentrações destes elementos. Apesar do maior nível de indução de MT estar frequentemente relacionado ao P2, a indução de MT não foi suficiente para distinguir as estações. Provavelmente, os metais encontrados no sedimento estavam sob a forma química e não sob a forma solúvel. Conseqüentemente, durante o período da exposição não exerceram influência na indução de metalotioneínas nos fígados das Tilápias.

se a presença de Cu, Cd e Zn em todas as amostras testadas. As concentrações nominais destes elementos mostraram-se bem mais elevadas quando comparadas com as concentrações presentes nas amostras líquidas (Tabela 4). Estas constatações demonstram que o panorama de toxicidade deste ambiente é bem claro: os metais-traços não se encontram biodisponíveis na coluna d'água. Eles encontram-se aderidos as partículas de sedimento das bacias de contenção.

Campanha	Parâmetro	Limite	P1	P2	P3	P4	P5
1	Mercurio (ug/L)	<0,0002	0,25	0,56	0,38	0,10	0,08
	Cobre (ug/L)	<0,009	0,039	0,072	0,069	0,030	0,156
	Chumbo (ug/L)	<0,01	0,049	0,051	0,053	0,061	0,026
	Zinco (ug/L)	<0,18	0,128	0,099	0,079	0,120	0,057
	Níquel (ug/L)	<0,025	0,032	0,044	0,046	0,031	0,027
	Cromo (ug/L)	<0,05	0,012	0,013	0,012	0,014	0,012
	Ferro (ug/L)	<0,3	0,818	0,349	0,321	0,609	0,640
	Manganês (ug/L)	<0,1	0,078	0,066	0,055	0,078	0,035
	Alumínio (ug/L)	<0,1	4,164	2,072	1,496	3,374	0,652
	Cádmio (ug/L)	<0,001	0	0	0	0	0
	Arsênio (ug/L)	<0,01	0	0	0	0	0
	2	Mercurio (ug/L)	<0,0002	0,76	0,44	0,67	0,50
Cobre (mg/L)		<0,009	0,05	0,04	0,05	0,03	0,16
Chumbo (ug/L)		<0,01	0	0	0	0	0
Zinco (ug/L)		<0,18	0,12	0,05	0,04	0,06	0,04
Níquel (ug/L)		<0,025	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Cromo (ug/L)		<0,05	0	0	0	0	0
Ferro (ug/L)		<0,3	2,44	1,22	0,61	1,15	0,24
Manganês (ug/L)		<0,1	0,12	0,05	0,05	0,06	0,02
Alumínio (ug/L)		<0,1	10,75	4,59	1,74	3,15	19,28
Cádmio (ug/L)		<0,001	0	0	0	0	0
Arsênio (ug/L)		<0,01	0	0	44	0	55
3		Mercurio (ug/L)	<0,0002	0,56	1,28	0,84	0,17
	Cobre (ug/L)	<0,009	0,03	0,03	0,03	0	0,19
	Chumbo (ug/L)	<0,01	0,04	0,04	0	0	0,04
	Zinco (ug/L)	<0,18	0,10	0,06	0,04	0,05	0,08
	Níquel (ug/L)	<0,025	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06
	Cromo (ug/L)	<0,05	0	0	0	0	0
	Ferro (ug/L)	<0,3	0,99	0,50	0,40	0,57	0,22
	Manganês (ug/L)	<0,1	0,10	0,05	0,04	0,05	0,03
	Alumínio (ug/L)	<0,1	3,34	0,77	0,62	1,53	0,44
	Cádmio (ug/L)	<0,001	0	0	0	0	0
	Arsênio (ug/L)	<0,01	0	0	0	0	0

Tabela 3. Resultado da análise dos metais nas amostras líquidas e valores limites estabelecidos pela CONAMA 357/2005.

Campanha	Parâmetro	Limite	P1	P2	P3	P4	P5
1	Cobre (µg/g)	2,5 (mg/Kg)	129,0	85,20	106,0	64,80	6,80
	Cromo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	7,0	12,20	33,90	2,400	3,000
	Cádmio (µg/g)	1,0(mg/Kg)	484,0	1090,0	27,60	564,0	14,20
	Níquel (µg/g)	2,5(mg/Kg)	23,50	148,0	356,0	30,30	51,30
	Chumbo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	152,0	120,0	207,0	136,0	22,20
	Zinco (µg/g)	2,5(mg/Kg)	228,0	1650,0	3530,0	174,0	170,0
2	Cobre (µg/g)	2,5(mg/Kg)	83,0	88,0	113,0	50,0	67,0
	Cromo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	13,60	18,400	16,600	10,900	19,500
	Cádmio (µg/g)	1,0(mg/Kg)	1270	1810,0	3160,0	772,0	19300
	Níquel (µg/g)	2,5(mg/Kg)	245,0	245,0	284,0	69,0	686,0
	Chumbo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	213,0	201,0	222,0	112,0	395,00
	Zinco (µg/g)	2,5(mg/Kg)	1870	2010,0	3340,0	918,0	1190,0
3	Cobre (µg/g)	2,5(mg/Kg)	1095	2530	3970	1500	1110
	Cromo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	131	122,0	95,3	99,2	2,5
	Cádmio (µg/g)	1,0(mg/Kg)	9,0	24,0	42,2	15,2	0,0
	Níquel (µg/g)	2,5(mg/Kg)	212,5	217	401	160,0	23,9
	Chumbo (µg/g)	2,5(mg/Kg)	193	238	223	211	30,4
	Zinco (µg/g)	2,5(mg/Kg)	1065	2700	4970	1300	63,5

Tabela 4. Resultado da análise dos metais nas amostras de sedimento e valores limites estabelecidos pela CONAMA 344/2004.

Presença de metais traços não essenciais (Al, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd) e essenciais (Fe, Zn, Mn) nas amostras líquidas e de sedimento foi responsável pelos diferentes níveis de indução de metalotioneínas nos pontos amostrados relacionados com a atividade de detoxificação celular desenvolvida pelos organismos expostos.

Este padrão de resposta biológica, verificada no ponto 1, nas amostras líquidas, (os mais tóxicos) e nos pontos 1, 2 e 5 nas amostras de sedimento, corresponde à ação tóxica exercida pela presença destes metais no ambiente. Os diferentes níveis de indução de metalotioneínas relacionados à ocorrência de metais traços essenciais (Cu, Zn, Fe, Mn) verificados nas amostras líquidas e nas amostras de sedimento, são atribuídos ao processo de homeostase celular que, conseqüentemente, indica a presença de concentrações destes metais no ambiente, exigindo dos organismos o desenvolvimento de um processo de regulação interna para a manutenção de suas atividades celulares vitais. Os resultados obtidos indicam a ocorrência de uma situação de estresse metabólico, que reflete uma ação tóxica proporcionada pelas concentrações destas classes de metais traços no ambiente.

De modo geral, as respostas dos organismos expostos às amostras ambientais da área estudada foram caracterizadas por diferentes níveis de indução de metalotioneínas correlacionadas principalmente com a presença de Al, Fe, Zn nas alocações amostrais. A metalotioneína mostrou-se, então, um indicador sensível da biodisponibilidade de metais nos corpos hídricos receptores analisados. Para

efeitos de reutilização da água, este biomarcador poderia ser uma ferramenta mais econômica em substituição as análises de monitoramento químico de rotina e forneceria subsídios para a adoção e seleção de processos adequados de descontaminação da massa hídrica, facilitando, assim, o seu reaproveitamento nos processos.

4 CONCLUSÕES

Neste estudo, as análises químicas revelaram a presença de metais-traços essenciais e não essenciais como: Mercúrio, Cobre, Zinco, Chumbo, Níquel, Cromo, Ferro, Manganês e Alumínio no ambiente de estudo, em diferentes concentrações entre os períodos de amostragem, embasando as respostas biológicas relativas à indução de metalotioneínas. Os valores das concentrações de metais determinados nas amostras líquidas de ambas as bacias de contenção podem ser considerados baixos, de acordo com a legislação brasileira (CONAMA 357) e, em geral, as águas das duas lagoas (P1-P4 e P5) podem ser classificadas como classe IV, permitidas para "outras utilizações", em atividades industriais que não afetem as atividades recreacionais primárias ou secundárias e o consumo animal.

Em relação à menor concentração de metais no sedimento do P2, uma explicação possível é que estes elementos devem estar em uma forma mais solúvel (espécie química) e, portanto, biodisponíveis no decurso do experimento, propiciando a indução das metalotioneínas. Apesar da maioria dos metais analisados terem sido encontrados em baixas concentrações nas matrizes amostrais, a análise de correspondência foi capaz de identificar uma relação entre as altas concentrações de Cu no P5 e a indução de metalotioneínas em peixes expostos às amostras locais, corroborando a precisão do uso da técnica empregada.

AGRADECIMENTOS

Todas as etapas desta pesquisa obtiveram êxito graças aos subsídios financeiros oriundos do Projeto ECOBRASKEM (FINEP/FAPEX) e da FAPESB

REFERÊNCIAS

- APHA. 1995. Standard methods. 19th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- BAYNE, B. L.; ADDISON, R.F.; CAPUZZO, J.M.; CLARKE, K.R.; GAY, J.J.; MOORE, M.N.; WARNICK, R.M. 1988. An Overview of the GEEP workshop. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 235-243.

- BOYD, C. E. 1995. Bottom soils, sediment and pond aquaculture. New York: Chapman and Hall. 348p.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama 344, de 25 de março de 2004; Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama 357, de 17 de março de 2005; Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 53, 18 mar. 2005.
- CHAN, K.M. **Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong.** Marine Pollution Bulletin, Vol. 31, Nos 4-12, pp. 411-415. 1995
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Procedimento para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo. Setembro. 1990a.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo. Outubro. 1990b.
- DEPLEDGE, MH. 1994. **The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools.** In: Fossi MC, Leonzio C, (eds) *Nondestructive biomarkers in vertebrates.* Lewis Publishers, Boca Raton, p 261-285
- EMBRAPA 1997 - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Centro Nacional de Pesquisas de solos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Manual de Métodos de Análise de Solo.** 2ª Ed. Revista Atualiza. 212p.
- ENGEL, D.W. & ROESJADI, G. 1987. **Metallothioneins: a monitoring tool.** In: **Pollution physiology of estuarine organisms.** New York: Academic Press. 421-437.
- FIRST, A. K.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, L.C.B. **Efluentes Líquidos do Pólo Petroquímico de Camaçari, Bahia: considerações sobre tratamento e disposição final.** São Paulo. 1991.
- KRAMER, K. J. M.; BROCKMANN, U. H.; WARWICK, R. M. 1994. Tidal estuaries: **Manual of Sampling and Analytical Procedures.** Brussels-Luxemburgo, p.304.
- LUCZAK, C., JANQUIN, M.A; KUPKA, A. 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345: 87-94.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A. 1998b. **The use of different organisms and biological levels to determine water and sediment quality at industrial sites.** Cuad. Investigación Biológica, Bilbao-Espanha: Universidad del Pais Vasco, v.20, p. 339-342.

NASCIMENTO, I. A. 2000. **Novos paradigmas da ecotoxicologia: resultados de testes ecotoxicológicos requerem validação em campo?** Revista Brasileira de Toxicologia. 13(2), 23-28.

NASCIMENTO, I.A. 2002. **Técnicas de coleta, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimentos para testes de toxicidade.** In: Métodos em Ecotoxicologia Marinha: aplicações no Brasil. Cap. II. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 262p.

RINGWOOD, A.H.; BROUWER, M. 1995. **Patterns of Metallothionein Expression in Oyster Embryos.** Marine Environmental Research 39, 101-103.

ROESIADI, G. 1996. **Metallothionein and its role in toxic metal regulation.** Comp. Biochem. Physiol Vol. 113C, N° 2, pp. 117-123, 1996 Copyright (c) 1996 Elsevier Science Inc.

VIARENGO, A. 1989. **Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level.** CRC crit. Rev. aquat. Sci. 1: 295-317

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. **A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs.** Marine Environmental Research, volume 44, n° 01, pp. 69-84.

MESTRE EM ECOLOGIA E BIOMONITORAMENTO (UFBA); ESPECIALISTA EM AUDITORIA AMBIENTAL (UGF); BIÓLOGO (UCSAL). E-MAIL: IGORLEORODRIGUES@HOTMAIL.COM

DOUTORA PELA USP, NA ÁREA DE MEIO AMBIENTE. PÓS DOUTORADO NA UNIVERSITY OF NORTH TEXAS, USA, BOLSISTA PQ DO CNPQ, PROF. TITULAR DA UFBA, E ATUALMENTE DIRETORA DE PESQUISA E COORDENADORA DO Mestrado Profissional em Bioenergia da FTC. E-MAIL: INASCIMENTO@FTC.BR

DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- BIOFÍSICA (UFRJ); MESTRE EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA (FIOCRUZ/RJ). PROFESSOR E PESQUISADOR DA UFRJ, INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO, LABORATÓRIO DE RADIOISÓTOPOS. E-MAIL: MREBELO@BIOF.UFRJ.BR

MESTRE EM GEOQUÍMICA AMBIENTAL (UFF-RJ). TEM EXPERIÊNCIA NA ÁREA DE BIOFÍSICA, COM ÊNFASE EM BIOTECNOLOGIA.

MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL URBANA (MEAU/ UFBA); ESPECIALISTA MBA EM GESTÃO AMBIENTAL (FACCEBA); BIÓLOGA (UCSAL). ATUA COMO PESQUISADORA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MARINHA E BIOMONITORAMENTO (UFBA).

DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA TECNOLOGIAS AMBIENTAIS (UNIVERSITY OF MANCHESTER INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY). PROFESSOR DA UFBA E COORDENADOR DA REDE DE TECNOLOGIAS LIMPAS - TECLIM. E-MAIL: ASHER@UFBA.BR