



Fernanda Monteiro Queiroz

**Estudo da distribuição subcelular e
destoxificação bioquímica elementar em duas
espécies de golfinho do sudeste Brasileiro**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
Química da Puc-Rio como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre

Coorientadora: Prof^a. Rachel Hauser Davis

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2019

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Fernanda Monteiro Queiroz

Bacharela em Ciências Exatas em 2015 e em Química em 2017 pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Atualmente trabalhando com o estudo de contaminação ambiental no ambiente aquático.

Ficha Catalográfica

Monteiro Queiroz, Fernanda

Estudo da distribuição subcelular e destoxificação bioquímica elementar em duas espécies de golfinho do sudeste brasileiro / Fernanda Monteiro Queiroz; orientadora: Tatiana Dillenburg Saint'Pierre; co-orientadora: Rachel Hauser-Davis. – 2019.

116 f: il. color; 30 cm

Dissertação (mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2019.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. *Pontoporia blainvillei*. 3. *Steno bredanensis*. 4. ICP-MS. 5. SEC-HPLC. 6. Estresse oxidativo. 7. MT. 8. GSH. I. Saint'Pierre, Tatiana Dillenburg. II. Hauser-Davis, Rachel Ann. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq, FAPERJ e PUC-Rio, pelas bolsas e verbas concedidas para a pesquisa. Ao Dr. Josino Costa Moreira, por permitir que eu usasse o seu laboratório na FIOCRUZ para realizar análises.

À minha orientadora Tatiana, por todo o suporte e atenção durante o meu mestrado.

À minha coorientadora Rachel, por toda a dedicação e paciência, assim como por todas as risadas ao longo desses dois anos.

À Ana Paula Di Benedetto e Helena Khering por cederem amostras de golfinho para este trabalho.

Ao Salvatore Siciliano, pela disponibilidade e pela permissão de uso das amostras de golfinho neste trabalho.

Ao Ricardo Lavandier, que liofilizou e macerou todas as amostras durante o seu doutorado.

Ao Marcos Frejat, pelos mapas e figuras lindas que ele fez.

Ao Rafael Rocha, por me ensinar a usar o espectrômetro de ICP-MS, preparar amostra, pela paciência quando alguma coisa dava errado e etc...

Ao meu marido, Gabriel, que me aguentou durante esses dois anos malucos e, mesmo assim, casou comigo. Por toda a paciência, incentivo, amor e ideias, mas acima de tudo, por enxergar sempre o melhor de mim.

Aos meus pais, Edson e Helena, por todo o amor, carinho, atenção, suporte e incentivo em todas as minhas escolhas, sem eles eu nunca teria chegado até aqui.

Ao Departamento de Química da PUC-Rio.

Resumo

Monteiro, Fernanda; Hauser-Davis, Rachel Ann; Saint’Pierre, Tatiana Dillenburg. **Estudo da distribuição subcelular e destoxificação bioquímica elementar em duas espécies de golfinho do sudeste Brasileiro**. Rio de Janeiro, 2019. p. 116 Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Uma das formas de detectar a contaminação ambiental é pela análise de respostas bioquímicas, ou biomarcadores, de tecidos de organismos-sentinela, como os mamíferos marinhos, uma vez que estes atuam como bioindicadores da saúde dos oceanos e de suas respectivas cadeias tróficas. A toninha (*Pontoporia blainvilei*) e o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) são animais com longa expectativa de vida e estão no topo da cadeia alimentar, sendo, portanto, considerados indicadores adequados de contaminação ambiental. Neste trabalho foram estudadas as concentrações de metais e metalóides, tanto não-essenciais quanto essenciais, em amostras de fígado, rim e músculo de indivíduos de *P. blainvilei* e *S. bredanensis* coletados na Região dos Lagos e Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, através da técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Além das concentrações totais, foram avaliados como estes se distribuem nas diferentes frações subcelulares, obtidas a partir de processos de extração diferencial. Além disso, foi avaliada também a indução de metalotioneína (MT) e glutatona reduzida (GSH), consideradas proteínas de resposta a este tipo de contaminação, por espectrofotometria na região do UV-visível. Não houve diferença significativa entre as concentrações de MT encontradas nos três tecidos analisados para ambas as espécies, nem para GSH em *P. blainvilei*. No entanto, foi verificada uma diferença significativa entre GSH de fígado e músculo em *S. bredanensis*. Como esperado, a concentração no fígado foi mais elevada, por este ser um órgão metabolicamente ativo, além do principal órgão de destoxificação. Em *P. blainvilei*, elementos como Al, As, Cd, Cr, Mn, Pb e Ti, apresentaram altas concentrações nas frações termolábil e termoestável de todos os tecidos avaliados, indicando que grande parte destes analitos está sendo destoxificado por complexação com MT ou outras proteínas e compostos não enzimáticos. Outros elementos, como Ag, Cu, Fe, Hg, Ni, Se, Sn e Zn, embora presentes nos indivíduos, apresentaram a maior parte de sua concentração na fração insolúvel, indicando que, provavelmente, as vias preferenciais de destoxificação

destes elementos nesta espécie não sejam realizadas através de MT. Em *S. bredanensis*, os metais Al e Cr também foram encontrados majoritariamente na fração insolúvel. Com relação às concentrações totais desses metais, níveis elevados para a maioria dos analitos foram observados em fígado, rim e músculo na espécie *S. bredanensis*. Diversas correlações estatisticamente significativas foram observadas entre elementos não-essenciais e essenciais em todas as frações subcelulares, no fígado e músculo de ambas espécies, através de uma análise de componentes principais. Além disso, alguns efeitos protetivos foram postulados contra elementos não-essenciais, avaliados a partir de cálculos de razões molares. Diferentes perfis foram observados para metaloproteínas contidas na fração termoestável destes indivíduos, através da técnica de cromatografia de alta eficiência acoplada a ICP-MS (HPLC-ICP-MS), indicando acúmulo dos metais e metalóides nos tecidos analisados, possível perturbação da homeostase dos elementos essenciais e tentativas de desintoxicação de metais não-essenciais por diversas metaloproteínas.

Palavras-chave

Pontoporia blainvillei; *Steno bredanensis*; ICP-MS; SEC-HPLC; estresse oxidativo; MT; GSH.

Abstract

Monteiro, Fernanda; Hauser-Davis, Rachel Ann; Saint’Pierre, Tatiana Dillenburg (Advisor). **Study on the subcellular distribution and elemental biochemical detoxification in two dolphin species from the Brazilian Southeast**. Rio de Janeiro, 2019. p. 116. Dissertação de Metreado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

One of the ways to detect environmental contamination is by analyzing biochemical responses, or biomarkers, in sentinel species tissues, such as marine mammals, as these animals act as bioindicators of ocean health and their respective trophic chains. Porpoises (*Pontoporia blainvilei*) and rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) present long-life expectancy and are at the top of the food chain and are, therefore, considered appropriate environmental contamination indicators. In this study, environmental contamination by metals and metalloids, both non essential and essential, was assessed by means of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), as well as their distribution in different subcellular fractions, obtained from differential extraction processes analysis, in *P. blainvilei* and *S. bredanensis* liver, kidney and muscle samples of individuals sampled from in the Lakes and Northern Fluminense regions, in the state of Rio de Janeiro. In addition, the induction of both metallothionein (MT) and reduced glutathione (GSH) considered response proteins to this type of contamination, were also assessed by spectrophotometry in the UV-visible region. No significant difference between MT concentrations in the three analyzed tissues were noted for both species. This was also observed for GSH in *P. blainvilei*. However, a significant difference was observed between liver and muscle GSH in *S. bredanensis*, and, as expected, liver concentrations were higher as this is a metabolically active and main detoxification organ. In *P. blainvilei*, metals like as Al, As, Cd, Cr, Mn, Pb e Ti were present in high concentrations in the thermolabile and thermostable fractions of all evaluated tissues, indicating that a significant portion of these analytes is being detoxified by complexation with MT or other proteins and non-enzymatic compounds. Some metals, such as Ag, Cu, Fe, Hg, Ni, Se, Sn e Zn although detected, were present mostly in the insoluble fraction, indicating that the preferred detoxification pathways of these elements in this species are probably not performed through MT. In *S. bredanensis*, Al and Cr were also detected in the insoluble fraction. Regarding the total concentrations of these metals, high levels

for most analytes were observed in *S. bredanensis* liver, kidney and muscle. Several statistically significant correlations between toxic and essential elements were observed in the liver and muscle of both species for all subcellular fractions, through a principal component analysis. In addition, some protective effects were postulated against toxic elements, evaluated from molar ratios calculations. Different profiles were observed for metalloproteins contained in the thermostable fraction of these individuals, using high efficiency chromatography coupled to ICP-MS (HPLC-ICP-MS), indicating metal and metalloid accumulation in the analyzed tissues, possible disturbance of elemental homeostasis and attempts to detoxify toxic metals by several metalloproteins.

Keywords

Pontoporia blainvillei; *Steno bredanensis*; ICP-MS; SEC-HPLC; oxidative stress; MT; GSH.

Sumário

1.	Introdução	15
1.1.	Contaminação ambiental e biomonitoramento	15
1.2.	Mamíferos marinhos como sentinelas da saúde dos oceanos	17
1.3.	Níveis e comportamento de metais subcelulares como ferramenta para avaliar possíveis efeitos tóxicos destes contaminantes.....	18
1.4.	Estresse oxidativo em organismos expostos à metais	19
1.5.	Técnicas analíticas utilizadas em estudos biomonitoramento	21
1.5.1.	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	21
1.5.2.	Hifenação SEC-HPLC-ICP-MS	22
1.5.3.	Espectrofotometria.....	23
2.	Objetivo	24
2.1.	Objetivo geral	24
2.2.	Objetivos específicos.....	24
3.	Metodologia	25
3.1.	Local de amostragem	25
3.2.	Espécies estudadas.....	26
3.2.1.	Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>).....	26
3.2.2.	Golfinho-de-dentes-rugosos (<i>Steno bredanensis</i>).....	28
3.3.	Coleta e processamento de amostras.....	29
3.4.	Extração das diferentes frações celulares das amostras	33
3.5.	Determinação de metalotioneína (MT) na fração subcelular termoestável	34
3.6.	Extração e determinação de Glutathione Reduzida (GSH)	34
3.7.	Quantificação de proteínas totais.....	35
3.8.	Quantificação de elementos nas frações subcelulares das amostras de golfinho	35
3.9.	Identificação de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS.....	36
3.10.	Parâmetros de mérito	38
3.11.	Análises estatísticas	38
4.	Resultados e discussão	39
4.1.	Quantificação da MT e da GSH	39
4.2.	Quantificação de metais e metalóides	42
4.2.1.	Parâmetros de mérito.....	42
4.2.2.	Distribuição subcelular de metais em <i>Pontoporia blainvillei</i>	43
4.2.2.	Distribuição subcelular de metais em <i>Steno bredanensis</i>	51

4.3.	Análise de Componentes Principais entre as variáveis MT, GSH e metais em <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	60
4.3.1.	<i>Pontoporia blainvillei</i>	60
4.3.1.1.	Fração Insolúvel (PPT)	60
4.3.1.2.	Fração Termolábil (FTL).....	63
4.3.1.3.	Fração Termoestável (FTE).....	63
4.3.2.	<i>Steno bredanensis</i>	66
4.3.2.1.	Fração Insolúvel (PPT)	66
4.3.2.2.	Fração Termolábil (FTL)	68
4.3.2.3.	Fração Termoestável (FTE).....	70
4.4.	Correlações de Spearman	73
4.5.	Razões molares.....	75
4.5.1.	Efeito protetor contra As	77
4.5.2.	Efeito protetor contra Cd.....	77
4.5.3.	Efeito protetor contra Hg.....	78
4.5.4.	Efeito protetor contra Pb.....	79
4.5.5.	Efeito protetor contra Ni.....	80
4.6.	Detecção de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS.....	80
4.6.1.	Metaloproteínas em <i>Pontoporia blainvillei</i>	81
4.6.2.	Metaloproteínas em <i>Steno bredanensis</i>	88
4.7.	Comparações entre <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	97
5.	Conclusões.....	105
	Referências bibliográficas	107

Lista de figuras

Figura 1. Locais de coleta de amostra. Fonte: Autoria própria, (ARCGis online 2018).....	26
Figura 2. Distribuição global da Toninha. Fonte: Siciliano et al. (2006).....	27
Figura 3. Toninha. Fonte: Adaptado de Jefferson, Webber e Pitman (2015).....	27
Figura 4. Distribuição do golfinho-de-dentes-rugosos no mundo. Fonte: Adaptado de Campos et al. (2011).	28
Figura 5. Golfinho-de-dentes-rugosos: Adaptado de Siciliano e Flach (2007)....	29
Figura 6. Calibração da coluna Superdex™-75.....	37
Figura 7. Concentrações de MT para (a) <i>P. blainvillei</i> (Fígado=5; rim=1; músculo=8) e (b) <i>S. bredanensis</i> (Fígado=8; rim=3; músculo=10).....	39
Figura 8. Concentrações de GSH para (a) <i>P. blainvillei</i> (Fígado=5; rim=1; músculo=8) e (b) <i>S. bredanensis</i> (Fígado=8; rim=3; músculo=10). * e # indicam diferenças significativas entres os tecidos.	41
Figura 9. Distribuição subcelular para Ag, Al, As, Cd, Cr e Cu nas amostras de <i>P. blainvillei</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	45
Figura 10. Distribuição subcelular para Fe, Hg, Mn, Ni Pb e Se nas amostras de <i>P. blainvillei</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	48
Figura 11. Distribuição subcelular para Sn, Ti e Zn nas amostras de <i>P. blainvillei</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	50
Figura 12. Distribuição subcelular para Ag, Al, As, Cd, Cr e Cu nas amostras de <i>S. bredanensis</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	53
Figura 13. Distribuição subcelular para Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se nas amostras de <i>S. bredanensis</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	56
Figura 14. Distribuição subcelular para Sn, Ti e Zn nas amostras de <i>S. bredanensis</i> . (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.	58
Figura 15, Gráficos de dispersão para discrição de PPT em fígado (PL), rim (PK) e músculo (PM) de <i>Pontoporia blainvillei</i> . (A) Função de discriminação 1 versus Função de discriminação 2, (B) Função de discriminação 2 versus Função de discriminação 3.....	62
Figura 16. Gráficos de dispersão para discrição de fígado, rim e músculo em FTE em fígado (PL), rim (PK) e músculo (PM) de <i>Pontoporia blainvillei</i> . (A) Função de discriminação 1 versus Função de discriminação 2, (B) Função de discriminação 2 versus Função de discriminação 3.	65
Figura 17. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular,	

renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de <i>Steno bredanensis</i> . Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.	67
Figura 18. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular, renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de <i>Steno bredanensis</i> . Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.	69
Figura 19. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular, renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de <i>Steno bredanensis</i> . Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.	72
Figura 20. Proteínas ligadas a As, Cd, Co e Cr observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado e músculo de <i>P. blainvillei</i> . (F) – (preto) - Fígado, (R)- (azul) - Rim. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).....	82
Figura 21. Proteínas ligadas à Cu, Hg, Ni e Pb observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de <i>P. blainvillei</i> . (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).....	83
Figura 22. Proteínas ligadas a Se, Sn, Ti e Zn observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de <i>P. blainvillei</i> . (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).	84
Figura 23. Proteínas ligadas a Cd, Co, Cr e Cu observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> . (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).	89
Figura 24. Proteínas ligadas a Fe, Hg Ni e Pb observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> . (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho)- Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).....	90
Figura 25. Proteínas ligadas a Se, Ti e Zn observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> . (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).	92
Figura 26.. Gráficos de dispersão para a função de discriminação de tecidos musculares, renais e hepáticos de PM e SM. (A) Função 1 versus	

Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. SM - *Steno bredanensis* músculo, SL - *Steno bredanensis* fígado, PM - músculo *Pontoporia blainvillei*, PL - fígado *Pontoporia blainvillei*. .. 99

Figura 27. Gráficos de dispersão para a discriminação de tecidos musculares e hepáticos de PM e SM. Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. Fígado: (C) Função 1 versus discriminante Função 2, (D) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. SM - *Steno bredanensis* músculo, SL - *Steno bredanensis* fígado, PM - músculo *Pontoporia blainvillei*, PL - fígado *Pontoporia blainvillei*. 102

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados das amostras de Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>) utilizadas neste estudo	31
Tabela 2. Dados das amostras de fígado de Golfinho-de-dentes-rugosos (<i>Steno bredanensis</i>).....	32
Tabela 3 . Condições operacionais do ICP-MS para a análise de metais	36
Tabela 4. Condições operacionais para as análises por SEC-HPLC-ICP-MS	37
Tabela 5. Limite de detecção, em $\mu\text{mol g}^{-1}$, para as análises de MT e GSH para <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	39
Tabela 6. Limites de detecção, em mg kg^{-1} , para a quantificação de metais por ICP-MS.....	42
Tabela 7. Concentrações e recuperações do material certificado (DORM-4).	43
Tabela 8. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de elementos em fígado, rim e músculo de <i>P. blainvillei</i> em PPT	61
Tabela 9. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de <i>P. blainvillei</i> em FTE.....	64
Tabela 10. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> em PPT.....	66
Tabela 11. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> em FTL	68
Tabela 12. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i> em FTE....	71
Tabela 13 . Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais essenciais encontrados em <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	73
Tabela 14. Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais não-essenciais encontrados em <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	74
Tabela 15. Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais não-essenciais e essenciais encontrados em <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i>	75
Tabela 16. Razões molares e possíveis efeitos protetores em <i>P. blainvillei</i> e <i>S. bredanensis</i> fígado, rim e músculo.	76
Tabela 17. Tempos de retenção para fígado, rim e músculo de <i>P. blainvillei</i>	86
Tabela 18. Intensidades relativas (em %) observadas para os analitos Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Ti e Zn em <i>P. blainvillei</i>	87
Tabela 19. Tempos de retenção observados para fígado, rim e músculo de <i>S. bredanensis</i>	94
Tabela 20. Intensidades relativas (em %) observadas para os analitos Cd, Co,	

Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Ti e Zn em <i>S. bredanensis</i>	95
Tabela 21. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de elementos em fígado, rim e musculo de <i>S. bredanensis</i> e <i>P. blainvillei</i> em PPT.	98
Tabela 22. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em músculo de <i>S. bredanensis</i> e <i>P. blainvillei</i> em FTE 100	
Tabela 23. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em fígado de <i>S. bredanensis</i> e <i>P. blainvillei</i> em FTE	101

1. Introdução

1.1. Contaminação ambiental e biomonitoramento

A partir do final do século XVIII, com a primeira revolução industrial, o desgaste causado ao ambiente cresceu significativamente, dado que, com o aumento da produção industrial, houve uma escalada exponencial na utilização de recursos naturais e na geração de resíduos e rejeitos industriais que acabam lançados no meio ambiente e levando, conseqüentemente, a problemas ambientais, como a degradação dos corpos de água e solos e deterioração na qualidade do ar. O desenvolvimento tecnológico está diretamente relacionado com a qualidade de vida e, conseqüentemente, com a evolução tecnológica houve um aumento na qualidade e expectativa de vida, resultando em crescimento populacional que, por sua vez, impulsionou a expansão das atividades industriais e, conseqüentemente, a um aumento dos despejos de rejeitos industriais no meio ambiente levando, assim, a uma maior degradação ambiental (Lusota, 2010).

Observou-se, no entanto, entre as décadas de 1960 e 1970, junto ao aumento do grau e da velocidade de deterioração ambiental, um crescimento na preocupação com a preservação do meio ambiente. O congresso dos Estados Unidos, por exemplo, ao longo da década de 1970, aprovou as primeiras legislações regulando os impactos sobre águas potáveis e poluição ambiental (ACS, 2019).

Contaminantes que têm recebido bastante atenção nas últimas décadas são os compostos organoclorados, metais, derivados de petróleo e pesticidas, todos conhecidos por sua toxicidade e persistência no ambiente, além de muitos apresentarem potencial de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica (Van Den *et al.*, 2011; Censi *et al.*, 2006; Suedel *et al.*, 1994). Estes compostos podem ser encontrados no ambiente devido a processos antrópicos ou naturais, como a exploração de petróleo, mineração, erosão de solos, despejo de resíduos industriais, queimadas, aplicação de pesticidas e adubos em lavouras, assim como intemperismo de rochas e erosão natural do solo, respectivamente (Esteves, 1988; Ramalho *et al.*, 2000; Mortatti e Probst, 1998; Jordão *et al.*, 1999; Nriagu e Pacyna, 1988; ANP, 2010; Yabe e Oliveira, 1998).

Mais especificamente, os metais e metalóides estão presentes usualmente nos sedimentos em ambientes aquáticos, sendo também encontrados solúveis em água, uma vez que as trocas entre essas fases são dinâmicas, tornando estes

compostos biodisponíveis e capazes de serem incorporados à biota e, desta forma, causar efeitos adversos ao longo da cadeia alimentar (Costa *et al.*, 2008, Shrivastava *et al.*, 2003; Conceição, 2004). Estes contaminantes podem ser classificados como não-essenciais ou essenciais. Elementos considerados não-essenciais, como Al, As, Pb, Hg e Sn, são aqueles que não apresentam função biológica, e, portanto, não são necessários no organismo, sendo que sua presença pode causar efeito adversos, ainda que presentes em pequenas quantidades (Forstner, 1999). Já os elementos considerados essenciais, como Co, Ni, Se e Zn, participam de diversos processos no organismo e suas deficiências podem ocasionar disfunções imunológicas. Entretanto, em quantidades acima do necessário, estes mesmos elementos essenciais também podem se tornar tóxicos (Santos *et al.*, 2005). Além disso, a toxicidade de um elemento depende, também, da forma química na qual este se encontra, assim como da quantidade do mesmo que foi absorvida pelo organismo. Alguns elementos como Hg, As, Cd e Pb não são tóxicos quando em suas formas elementares ainda que, quando associados a cadeias de carbono ou em forma de cátions, podem ser considerados perigosos (Melo, 2003; Baird, 2002).

Tendo em vista os efeitos adversos que os contaminantes, tanto orgânicos quanto inorgânicos, podem causar, é necessário que estudos de monitoramento em áreas contaminadas sejam realizados. Uma das estratégias usadas para este fim é conhecida como biomonitoramento, que consiste na avaliação da qualidade ambiental ao longo de um determinado período de tempo em uma região pré-determinada, utilizando respostas de organismos bioindicadores para avaliar e monitorar mudanças ocorridas no ambiente (Lima, 2000; Souza e Fontanetti, 2007).

Durante o biomonitoramento, são avaliados organismos bioindicadores, que podem ser espécies, populações ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e/ou condições de saúde forneçam informações sobre a condição ambiental de uma determinada área. Estes organismos podem apresentar correlações diretas com fatores ambientais, e suas reações à contaminação ambiental estão relacionadas diretamente às condições físicas, químicas e biológicas do ambiente, assim como às condições fisiológicas, morfológicas e nutricionais dos indivíduos (Bagliano, 2012). Já o uso de biomarcadores, definidos como substâncias, produtos de biotransformação ou mudanças bioquímicas precoces em tecidos ou fluidos biológicos, indica a intensidade da exposição a substâncias químicas sofrida por um organismo (Amorim, 2003).

1.2. Mamíferos marinhos como sentinelas da saúde dos oceanos

Mamíferos que habitam majoritariamente o oceano e/ou dependem deste para se alimentar são denominados mamíferos marinhos, grupo este que inclui os golfinhos (Jefferson, Webber, Pitman, 2015). Estes animais são considerados excelentes espécies sentinelas quanto à saúde dos oceanos, uma vez que são capazes de viver por muitos anos e são, em sua maioria, predadores topo de cadeia no ambiente aquático. O estudo destes indivíduos permite avaliações quanto à bioacumulação e biomagnificação de diversos contaminantes, incluindo metais e metaloides (Baptista, *et al.* 2016; De Moura, *et al.*, 2014).

Os mamíferos marinhos apresentam alta proximidade fidedigna com os seres humanos, uma vez que, além de ambos estarem no topo da cadeia alimentar, apresentam absorção de contaminantes praticamente exclusivamente da sua alimentação, sendo a absorção destes compostos pela respiração considerada insignificante (Augier *et al.*, 1993; Gray, 2002). O habitat natural destes animais vem sofrendo diversos tipos de ameaças, devido à sua contaminação por diferentes substâncias químicas. Desta forma, os mamíferos marinhos podem ser então utilizados em estudos de biomonitoramento como bioindicadores das condições ambientais de ecossistemas aquáticos, assim como dos efeitos adversos decorrentes da contaminação por metais e compostos orgânicos, que incluem doenças infecciosas, falhas reprodutivas e altas taxas de mortalidade (Morales, 2007; Tanabe, 2002; Siciliano *et al.*, 2005; Moura, 2009).

Em mamíferos marinhos, órgãos como fígado e rins são considerados os principais órgãos de destoxificação, filtração e eliminação de toxinas e, geralmente, apresentam elevadas concentrações de contaminantes. O músculo, por outro lado, é o principal tecido de acumulação de contaminantes, possivelmente indicando sobrecargas nos órgãos excretores (Seixas, 2008, Souza *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, as análises dos tecidos de várias espécies de mamíferos marinhos vêm sendo utilizadas na avaliação da poluição marinha por metais e contaminantes orgânicos no mundo todo, demonstrando que os mamíferos marinhos são diretamente afetados pela degradação e a contaminação do ecossistema marinho. Exemplos destes estudos de biomonitoramento com golfinhos incluem os trabalhos realizados por Beck e colaboradores (1997) em amostras de *Tursiops truncatus* (golfinhos-nariz-de-garrafa) encalhados na Carolina do Sul, Bennett e colaboradores (2001), acerca de possíveis doenças infecciosas oriundas da exposição a metais em *Phocoena phocoena* (golfinhos-do-Porto) na Inglaterra e País de Gales, Kehrig e

colaboradores (2016) sobre o acúmulo de Se e Hg em fígado e músculo de *Pontoporia blainvillei* (toninha) e *Sotalia guianensis* (boto cinza) e Lavandier e colaboradores (2019), que analisaram a presença de bifenilas policloradas e polibromadas em fígados e músculos de *Tursiops truncatus* (golfinho nariz de garrafa) e *Stenella frontalis* (golfinho pintado do atlântico).

1.3. Níveis e comportamento de metais subcelulares como ferramenta para avaliar possíveis efeitos tóxicos destes contaminantes

Diversos estudos analisando as cargas totais de metais em mamíferos marinhos têm sido realizados nos últimos anos, como por exemplo os trabalhos realizados por Mapunda e colaboradores (2017) em rins, fígado e pulmões de *Tursiops aduncus* (golfinho roaz) da Tanzânia, Meng-Hsien e colaboradores (2017) em músculo, pulmão, fígado e rim de *Grampus griseus* (golfinho-de-risso), *Lagenodelphis hosei* (golfinho de Fraser), *Stenella attenuata* (golfinho pintado pantrocinal) e *Kogia simus* (cachalote-anão) do Oceano Pacífico Ocidental e Xiang e colaboradores (2017) na epiderme, músculo e fígado de *Sousa chinensis* (golfinho branco chinês) encontrados na costa da China. No entanto, a maioria desses estudos avaliam apenas as quantidades totais de metais e não investigam a biodisponibilidade intracelular desses contaminantes. Uma vez que esses elementos atravessam a membrana celular, podem sofrer compartimentalização e destoxificação, afetando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, o potencial destes contaminantes de causar efeitos deletérios, uma vez que os metais insolúveis não são capazes de causar esses feitos. Isto indica que as quantidades totais não são uma maneira confiável de expressar contaminação ambiental e possíveis efeitos tóxicos (Marijić *et al.*, 2016; Decataldo *et al.*, 2004).

Algumas proteínas encontradas na fração citosólica, como a metalotioneína (MT) e a Glutathiona reduzida (GSH), são conhecidas por sua importância na toxicocinética intracelular de metais e são, geralmente, responsáveis pela sua destoxificação por meio de complexação com os mesmos. Embora alguns metais presentes na fração solúvel possam ser destoxificados através da MT ou por proteínas similares, a maioria ainda pode permanecer disponível e ser capaz de interagir com diferentes componentes celulares, levando a efeitos adversos nestes organismos (Marijić, *et al.* 2016; Decataldo *et al.*, 2004). Dessa forma, a determinação de cargas subcelulares de metal e metalóides tem

sido recomendada, de modo a melhor avaliar os resultados de contaminação por metais em mamíferos marinhos.

1.4. Estresse oxidativo em organismos expostos à metais

As alterações nos níveis de proteínas de alguns órgãos, como fígado e rim, são capazes de indicar a indução ou inibição de certas proteínas e/ou enzimas, de forma que níveis elevados podem sugerir a síntese de enzimas de biotransformação, que podem auxiliar no processo de destoxificação do organismo, tornando-se, portanto, importantes na avaliação de efeitos subletais de contaminantes ambientais em organismos aquáticos (Hauser-Davis, 2013; Hauser-Davis *et al.*, 2014).

Os metais são capazes de inativar enzimas e desnaturar proteínas, assim como alterar diversas atividades celulares, podendo, também, levar ao estresse oxidativo, uma vez que a presença desses contaminantes no organismo estimula a produção de radicais livres por meio da combinação de radicais hidroxila ou de outros radicais reativos intracelulares (Ferreira e Matsubara, 1997; Jesus e De Carvalho, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), como OH^- , O_2^- e H_2O_2 , possuem funções biológicas no organismo e estão envolvidas em processos de produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose e síntese de substâncias biológicas consideradas importantes. No entanto, quando em concentrações excessivas no organismo, podem ocasionar efeitos adversos como, por exemplo, a peroxidação dos lipídios de membrana celular (Barreiros e David, 2006). O estresse oxidativo ocorre devido à presença excessiva destes radicais dentro da célula, sendo então caracterizado pelo desequilíbrio entre os compostos oxidantes gerados por *stress* celular e os sistemas de defesa antioxidantes, quando os mecanismos de defesa celular não são capazes atuar, devido à presença excessiva de radicais livres (Ramos *et al.*, 2000). Algumas defesas antioxidantes incluem a atuação da Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione S-transferase (GST), a Glutathione Peroxidase (GPx), a Glutathione reduzida (GSH), a Glutathione Redutase (GR), o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (Hermes-Lima, 2004).

A GSH é um tripeptídeo com capacidade antioxidante. Entre suas principais funções no organismo está seu envolvimento em processos metabólicos e de transporte, prevenção contra a formação de radicais livres e equilíbrio redox da célula, além de auxiliar na defesa celular pela biotransformação e eliminação

de xenobióticos (Canesi *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2008; Lushchak, 2012). Este grupamento atua como captador de espécies reativas de oxigênio e metais, servindo como substrato em reações de redução-oxidação, especialmente para íons de cádmio (Cd) (Damasceno *et al.*, 2002). Em diversos estudos em organismos aquáticos, a quantificação da GSH tem sido utilizada como biomarcador protéico de estresse oxidativo em relação à presença de contaminantes, como hidrocarbonetos e metais (Hauser-Davis, 2008), como por exemplo, no trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2004) e Ji e colaboradores (2012), sobre a alteração da concentração de GSH em peixes após exposição a contaminantes orgânicos. Estudos a respeito do comportamento da GSH em animais, como golfinhos, também já foram realizados, e sua relação com metais (Kehrig *et al.*, 2016; Macfarlane *et al.*, 2006; Vijayavel e Balasubramanian, 2006). Dessa forma, estudos anteriores demonstram que este tripeptídeo se mostra alterado quando animais são expostos a diferentes tipos de contaminantes, apresentando potencial como um biomarcador de contaminação ambiental em organismos aquáticos.

A metalotioneína (MT), identificada pela primeira vez em 1957, em cavalos, tem sido foco de vários estudos quanto ao seu papel no organismo. Inicialmente, essa metaloproteína de baixo peso molecular (6-7 kDa), foi identificada devido à sua capacidade de se ligar ao Cd, com sua afinidade por íons metálicos dos grupos IB e IIB da tabela periódica reconhecida, posteriormente. Entre suas principais funções no organismo, ela é responsável pela homeostase de metais essenciais e pela destoxificação de elementos não-essenciais e de elementos essenciais em excesso (Sarkars *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2007; Viarengo *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2008.; Motta, 2012). Diversos estudos sugerem que esta metaloproteína está diretamente relacionada com a exposição do organismo a metais, reportado para peixes, mexilhões, golfinhos e outros. Desta forma, estas podem ser aplicadas como biomarcadores quanto à exposição a esses contaminantes sendo, portanto, utilizadas como ferramenta em estudos de biomonitoramento (Linde *et al.*, 1999; Nicholson e Lam, 2005; Monserrat *et al.*, 2007; Viarengo *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2008; Kehrig *et al.*, 2016).

1.5. Técnicas analíticas utilizadas em estudos biomonitoramento

1.5.1. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Entre as diversas técnicas analíticas disponíveis atualmente para a quantificação de metais e metaloides, a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) é uma das que mais se destaca, uma vez que é multielementar, com capacidade de detectar aproximadamente 70 elementos diferentes, além de possuir alta sensibilidade, aliada à alta resolução espectral, para determinação isotópica multielementar, e baixos limites de detecção (Analytik Jena; Machado *et al.*, 2017).

Um equipamento de ICP-MS é constituído por uma fonte de energia, neste caso o plasma, um sistema de introdução de amostra, interface, lentes iônicas, separadores de massa e um detector. No sistema de introdução de amostra estão o nebulizador, que geralmente utiliza um fluxo de gás nebulizador para criar um aerossol, a partir da solução do analito, e a câmara de nebulização que seleciona uma pequena porcentagem do aerossol, geralmente uma porcentagem inferior à 5% da amostra, correspondente também à sua fração mais homogênea, que será levada ao plasma para ser atomizada, de forma que chegue analito suficiente, mas que não existam partículas muito grandes que apaguem o plasma. A tocha é composta de quartzo e auxilia no direcionamento do plasma, que é gerado por uma bobina de Tesla. Esta última, por sua vez, é formada por três tubos concêntricos, por dentro dos quais passa um fluxo de argônio. O fluxo de argônio, que é o gás mais frequentemente utilizado para a geração do plasma, se dá na seção mais externa, o fluxo do gás auxiliar, que tem como objetivo resfriar o equipamento e impedir o superaquecimento de qualquer peça, se dá na seção intermediária e, na seção mais interna, se dá o fluxo do aerossol contendo a amostra. A interface é composta pelo amostrador, *skimmer* e parador de fótons, que permitem que a pressão dentro do equipamento seja reduzida sem causar espalhamento dos cátions, permitindo então a existência do ICP-MS. O separador de massas é o responsável por separar os cátions, a partir de suas razões massa/carga (Giné, 1998; Boss e Fredeen, 1997, Thomas, 2002; Giné-Rosias, 1999; Chaves, 2008).

É possível introduzir amostras sólidas, líquidas e gasosas em um ICP-MS, no entanto as amostras líquidas são mais comumente utilizadas devido ao fato de

que estas apresentam, normalmente, mais homogeneidade, além de serem mais fáceis de manipular (Montaser, 1998; Giné-Rosias, 1999).

O analisador de massas do tipo quadrupólo gera um campo de corrente contínua, criado pela alternância dos pares de hastes entre radiofrequência e tensão. Quando uma tensão específica é ampliada nas hastes o analito de interesse, ou seja, aquele que responde àquela tensão devido à sua razão massa/carga, se orienta no meio das quatro hastes até o detector, enquanto os analitos que possuem diferentes razões massa/carga são eliminados pelos espaços entre as barras. No detector, o analito se choca com diodos, que convertem o sinal em um pulso elétrico (Thomas, 2002).

Esta técnica tem sido muito utilizada para quantificar elementos 'não-essenciais e essenciais em organismos aquáticos sendo, dessa forma, uma ferramenta valiosa na detecção de impactos ambientais. Além disso, é uma técnica versátil, que permite seu acoplamento com outras técnicas analíticas, de forma que seja possível realizar estudos aprofundados (Michalke, 2002).

1.5.2. Hifenação SEC-HPLC-ICP-MS

Uma das técnicas analíticas que podem ser acopladas ao ICP-MS é a cromatografia líquida de alta eficiência – ou HPLC (do inglês, *High performance liquid chromatography*), que permite a separação de várias substâncias, a partir de diferentes velocidades de migração e afinidade pela fase móvel e/ou fase estacionária. Com essa técnica, é possível realizar a separação de diversos compostos, presentes nos mais variados tipos de amostras (Collins *et al.*, 1995; Garcia De Araújo *et al.*, 2007).

O equipamento de HPLC é constituído por um reservatório de solventes, no qual são encontrados os solventes da fase móvel; um sistema de bomba, responsável por impulsionar os solventes da fase móvel; uma coluna cromatográfica, na qual ocorre a separação dos analitos presentes na amostra; um injetor e um detector (Collins *et al.*, 1995; Gil, 2007).

O acoplamento SEC-HPLC-ICP-MS é definido quando se utiliza o ICP-MS em conjunto ao HPLC e colunas de exclusão por tamanho (do inglês, *size exclusion chromatography* – SEC, em tradução livre), que são bastante utilizadas nos processos de separação de biomoléculas. As colunas do tipo SEC geralmente são utilizadas para a separação inicial de proteínas e peptídeos contidos em uma fração já purificada da amostra e são, mais comumente, detectadas por absorção na faixa ultravioleta-visível (UV-Vis). Nesse tipo de método não é esperado que

haja alterações nos analitos ao passar pela coluna, o que o torna um método muito vantajoso (Shaumlöffel, 2007; Tastet *et al.*, 2008).

Esta técnica vem sendo usada para caracterizar metaloproteínas em diferentes tecidos de organismos vivos, como bÍlis, baço, rim, fÍgado, coração e músculo de peixes e mamÍferos (González-Fernández *et al.*, 2008; Gonzalez-Fernández *et al.*, 2011; Hauser-Davis *et al.*, 2012).

A técnica de acoplamento SEC-HPLC-ICP-MS está em constante evolução na área de estudos de biomoléculas, dado que permite a separação dos analitos de interesse em suas formas químicas constituintes, levando à identificação de diferentes frações de amostras proteicas e possui diversas vantagens como, por exemplo, menor contaminação das amostras, análises mais rápidas, menos perdas de amostras, maior reprodutibilidade em comparação a outros métodos e menores riscos de oxidação ou degradação das amostras por bactérias (Michalke, 2002).

1.5.3. Espectrofotometria

A técnica analítica que com base a medição de radiação transmitida ou absorvida é conhecida por espectrofotometria. As faixas de radiação mais comumente empregadas nessa técnica são as regiões do visível (400-800 nm) ou ultravioleta (200-400 nm) do espectro eletromagnético (Settle, 1997; Gore, 2000).

O equipamento conhecido por espectrofotômetro é formado por uma fonte estável de energia, geralmente uma lâmpada de deutério e de tungstênio para a absorção molecular ou uma lâmpada de catodo oco para absorção atômica, um recipiente transparente, conhecido como cubeta, para conter a amostra; um monocromador, responsável por selecionar o comprimento de onda utilizado durante a análise e minimizar interferências, e um detector (Skoog *et al.*, 1998).

A espectrofotometria na região UV-Vis é considerada uma técnica analítica robusta e de baixo custo apresentando, também, alta sensibilidade e podendo ser empregada para os mais variados tipos de amostras e/ou análises (Rocha e Teixeira, 2004). Dessa forma, essa técnica vem sendo bastante utilizada na quantificação de proteínas e atividades enzimáticas, sendo assim uma ferramenta importante nos estudos de contaminação ambiental (Bastos *et al.*, 2013; Lavradas *et al.*, 2014).

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Avaliar a distribuição subcelular de metais, metalóides e proteínas biomarcadoras em diferentes órgãos/ tecidos de duas espécies de golfinho, toninha (*Pontoporia blainvillei*) e golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*), da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a distribuição subcelular de Ag, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ti e Zn em fígado, rim e músculo de *Pontoporia blainvillei* e *Steno bredanensis* coletados ao longo da costa do estado do Rio de Janeiro;
- Avaliar os processos de destoxificação desses metais nos órgãos/tecidos os indivíduos coletados;
- Determinar as concentrações de MT e GSH em fígado, rim e músculo dos mesmos indivíduos por espectrofotometria UV-Vis;
- Caracterizar as metaloproteínas termoestáveis presentes em fígado, rim e músculo dos golfinhos por acoplamento HPLC-ICP-MS;
- Realizar análises estatísticas para comparações das concentrações de metais, metalóides e proteínas nos golfinhos, assim como as possíveis correlações entre as concentrações de metais e metalóides com as concentrações das proteínas;
- Calcular as razões molares a partir das correlações significativas entre metais não-essenciais e essenciais e inferir possíveis efeitos protetores.

3. Metodologia

3.1. Local de amostragem

A região de estudo abrange aproximadamente 300 km do litoral do estado do Rio de Janeiro, que possui extensão total de 635 km, e situa-se entre a região dos Lagos e o litoral da região Norte Fluminense.

Composta por nove municípios, a região dos Lagos tem como principal polo econômico a cidade de Cabo Frio, com população estimada em 216.030 habitantes para o ano de 2017. Por sua vez, a região Norte Fluminense é constituída por 10 municípios, cuja população representa cerca de 10 % da população estadual, concentrada especialmente em seus polos regionais: Campos dos Goytacazes e Macaé, com populações estimadas, para o ano de 2017, em 490.228 habitantes e 244.139 habitantes, respectivamente (IBGE CIDADES, 2017).

As regiões estudadas apresentam alto índice crescimento econômico e correspondem a, aproximadamente, 20 % do PIB do estado do Rio de Janeiro, sendo o PIB do Norte Fluminense o maior do estado, menor apenas que o da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (IBGE Cidades, 2017). Dentre os setores da atividade econômica, a indústria é o que compõe a maior parcela do PIB dessa região. Devido à localização ao longo da faixa litorânea que emoldura a bacia de Campos, grande parte da renda e da produção local está diretamente atrelada à cadeia produtiva do petróleo e seus derivados (SEBRAE/RJ, 2015). Isto é interessante, pois, de acordo com Sun e colaboradores (2017), com o crescimento econômico de uma determinada região e a presença de industriais da cadeia produtiva do petróleo, é possível que a contaminação por metais na região aumente significativamente, consequentemente, aumentando seus possíveis efeitos deletérios na biota.

A Figura 1 marca os pontos de coleta das amostras de golfinhos utilizadas no presente estudo, passando pelos municípios de Araruama, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Armação de Búzios, Cassimiro de Abreu, Quissamã, Campos dos Goytacazes, São João da Barra e São Francisco de Itabapoana.



Figura 1. Locais de coleta de amostra. Fonte: Autoria própria, (ARCGis online 2018).

3.2. Espécies estudadas

3.2.1. Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

A distribuição geográfica da Toninha se dá ao longo da costa leste da América do Sul (Figura 2), passando pelos países Brasil, Argentina e Uruguai, entre o Golfo de São Matias e o estado do Espírito Santo, algumas vezes sendo encontrada no estuário do rio da Prata. No entanto essa distribuição não é contínua, sendo reportado que essa espécie é rara ou ausente na região central/norte do estado do Rio de Janeiro e no sul do estado Espírito Santo (IUCN, 2018).

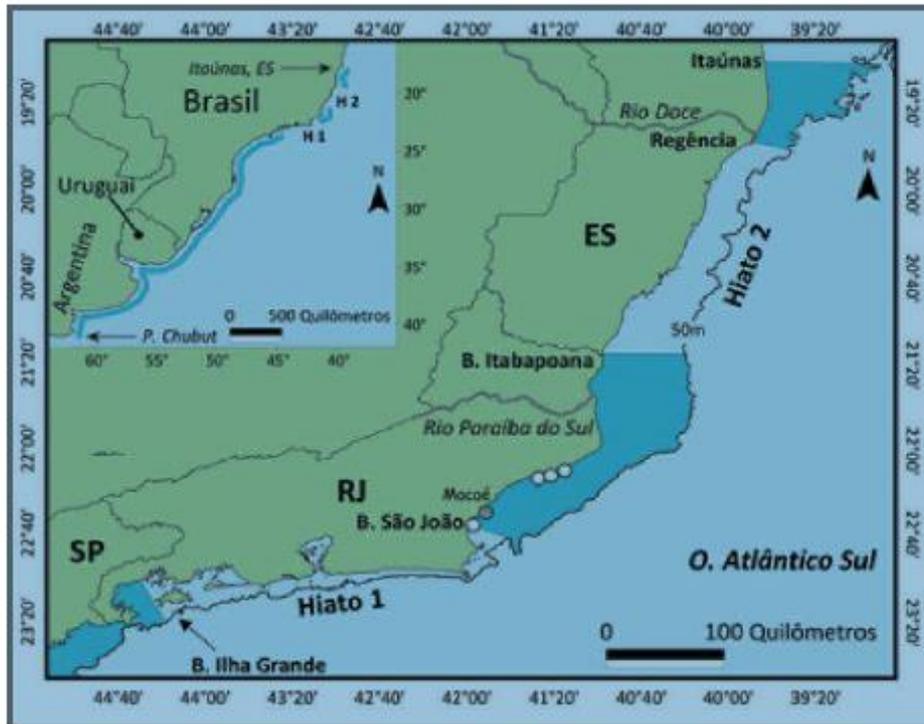


Figura 2. Distribuição global da Toninha. Fonte: Siciliano *et al.* (2006).

A Toninha (Figura 3) apresenta um padrão de coloração consistente, tendo a parte superior cinza escuro e a parte inferior variando entre marrom claro e cinza claro. Duas formas distintas desta espécie são observadas na natureza ao longo de sua área de distribuição, sendo as que vivem na região norte menores do que as que vivem no sul. Os machos, que atingem um comprimento de 1,63 m, são menores do que as fêmeas, que podem atingir 1,77 m. A expectativa média de vida é em torno de 10 anos, embora machos possam viver até 15 anos e fêmeas, 21 anos (Jefferson, Webber e Pitman, 2015).

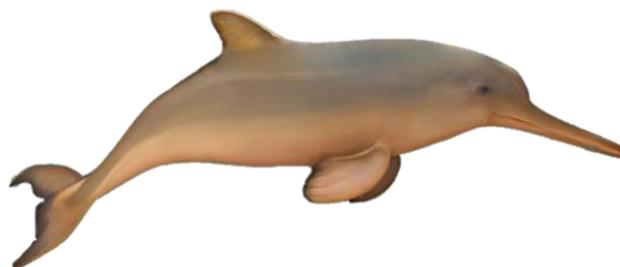


Figura 3. Toninha. Fonte: Adaptado de Jefferson, Webber e Pitman (2015)

Como sua observação na natureza é rara, o comportamento da espécie foi escarçamente registrado, resultando em poucos dados disponíveis a respeito

deste. Algumas das características comportamentais conhecidas são os hábitos solitários, coexistindo em grupos de, no máximo, 15 indivíduos, tendência a evitar embarcações e o fato de não apresentarem hábitos migratórios, muito embora tenham sido observadas movimentações entre o litoral e o alto mar em determinados períodos do ano (Jefferson, Webber e Pitman, 2015).

Normalmente se alimentam de peixes de águas rasas e crustáceos, sendo que durante a juventude costumam se alimentar regularmente de camarão e durante a vida adulta tendem a comer mais peixes. Costumam ser presas de grandes tubarões e orcas. Devido ao fato de diversas vezes ser alvo de pesca acidental, além da degradação e poluição do ambiente aquático, sendo assim uma considerada uma espécie em extinção (Jefferson, Webber e Pitman, 2015; IUCN, 2018).

3.2.2. Golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*)

O golfinho-de-dentes-rugosos é distribuído pelos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, normalmente habitando águas profundas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 4), no entanto já foram reportados espécimes em regiões costeiras no Brasil e na África. As regiões do Golfo do México e Caribe também já foram citadas como habitat para esta espécie (IUCN, 2018).



Figura 4. Distribuição do golfinho-de-dentes-rugosos no mundo. Fonte: Adaptado de Campos *et al.* (2011).

Fisicamente, o golfinho-de-dentes-rugosos (Figura 5) é caracterizado por ser um animal robusto com uma cabeça longa e cônica. Quanto a sua coloração, apresenta três cores, cinza escuro, presente na maior parte do corpo, cinza

intermediário nas laterais e branco no maxilar, barriga e lábios, além de algumas manchas. Os indivíduos mais novos são mais claros e não costumam ter as manchas brancas. Quando adultos, podem medir até 2,80 metros e pesar até 155 kg, sendo os machos maiores do que as fêmeas. É considerada uma espécie relativamente fácil de ser identificada quando vista de perto, devido a especificidade de suas características físicas (Jefferson, Webber e Pitman, 2015).



Figura 5. Golfinho-de-dentes-rugosos: Adaptado de Siciliano e Flach (2007).

Normalmente, esta espécie é encontrada em grupos de 20 indivíduos, embora já tenham sido observados grupos de até 100 animais. Sua dieta é composta por lulas, polvos e peixes, como, por exemplo, o *Coryphaena hippurus*, popularmente conhecido como dourado-do-mar (Jefferson, Webber e Pitman, 2015).

Embora essa não seja a espécie de golfinho tropical mais comum, ela também não pode ser considerada uma espécie ameaçada, uma vez que não são conhecidas pescarias que foquem nesse animal em específico, embora possam ocorrer capturas acidentais do mesmo. Uma vez que não existem muitas informações acerca da biologia, tamanho populacional, subdivisões da população e comportamento migratório desta espécie, ela pode ser considerada uma espécie data deficiente, mostrando assim a necessidade de mais estudos sobre este animal (IUCN, 2018).

3.3. Coleta e processamento de amostras

A coleta das amostras foi realizada pelo Grupo de Estudos de Mamíferos, Aves e Répteis Marinhos e Costeiros da Região dos Lagos (GEMM-Lagos), coordenado pelo pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Dr. Salvatore Siciliano, entre os anos de 2001 e 2012. Todas as coletas se deram a

partir do monitoramento de praias pertencentes ao litoral Norte Fluminense e a Região dos Lagos, com autorização do SisBio, sob a licença 19665-1.

Durante o processo de coleta, o sexo dos espécimes foi determinado através da observação de fendas genitália, anal e mamária. As amostras foram extraídas com o auxílio de uma faca de aço inox e armazenadas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL ou frascos de vidro a -20 °C. Para melhor preservação das amostras estas foram congeladas a -80 °C por e em seguida encaminhadas para um liofilizador até total secagem das amostras (Lemos, 2012; Lavandier, 2019).

Todos os dados referentes às amostras utilizadas neste estudo estão dispostos nas Tabelas 1 e 2. Para algumas amostras não foi possível determinar o sexo do animal, devido ao estágio de decomposição que estes se encontravam quando houve a coleta. Nestes casos, o sexo foi identificado como não definido (ND).

Tabela 1. Dados das amostras de Toninha (*Pontoporia blainvillei*) utilizadas neste estudo

Amostrac	Código	Órgao			Data de obtenção	Modo de obtenção	Local	Sexo	CT (cm)
		Músculo	Fígado	Rim					
GEMM 236	P1		X		12/11/10	Encalhe	Farol de São Thomé, CG	M	119
GEMM 358	P2		X		16/01/12	Captura Acidental	Praia do Açú, SJB	ND	125
GEMM 363	P3	X			29/01/12	-	Praia das Flexeiras, QU	ND	89
GEMM 364	P4		X		30/01/12	-	Praia do Visgueiro, QU	ND	115
GEMM 376	P5	X			05/03/12	Encalhe	Praia dos Anjos, AC	M	123
GEMM 410	P6		X		28/08/12	Encalhe	Barra do Furado, CG	ND	-
GEMM 414	P7	X			31/08/12	Captura	Praia das Flexeiras, QU	-	-
GEMM 426	P8	X			23/09/12	Captura	Praia de Flexeiras, QU	-	-
6A01-680/MC01	P9	X			14/11/12	-	QU	-	-
GEMM 428	P10	X			25/09/12	Captura	Praia do Visgueiro, QU	M	-
6A03-699/MC01	P11	X			15/10/12	-	QU	-	-
6A00-1389/MC01	P12	X	X	X	-	-	-	-	-

F – Fêmea. M – Macho. ND – Não definido. AC – Arraial do Cabo. QU – Quissamã. CG – Campos dos Goytacazes. SJB – São João da Barra. CT – Comprimento total.

Tabela 2. Dados das amostras de fígado de Golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*).

Amostra	Código	Órgao			Data de obtenção	Modo de obtenção	Local	Sexo	CT (cm)
		Músculo	Fígado	Rim					
GEMM 80	S1		X	X	24/06/2005	Encalhe	Praia de Tucuns, AB	F	267
GEMM 99	S2		X		30/04/2006	Captura Acidental	Praia do Foguete, CF	M	260
GEMM 100	S3	X			30/04/2006	Encalhe	Praia do Foguete, CF	ND	250
GEMM 107	S4		X		08/07/2006	Encalhe	Prainha, AC	M	272
GEMM 121	S5	X		X	28/03/2007	Encalhe	Prainha, AC	M	274
GEMM 150	S6	X			07/08/2008	Encalhe	Praia Seca, AR	ND	240
GEMM 166	S7	X			04/05/2009	Encalhe	Praia do Forte, CF	ND	260
GEMM 237	S8	X			14/11/2010	Encalhe	Praia do Forno, AC	ND	200
GEMM 301	S9	X	X		08/06/2011	Captura Acidental	Praia dos Antunes, Praia Seca, AR	M	255
GEMM 320	S10	X	X		17/08/2011	Encalhe	Praia do Foguete, CF	F	260
GEMM 327	S11	X	X	X	08/09/2011	Encalhe	Praia do Pesqueirinho, Morro do Vigia, Praia do Perú, CF	F	280
GEMM 328	S12	X	X		16/09/2011	Captura Acidental	Praia Rasa, AB	F	264
BB 500	S13	X	X		2005		Norte Fluminense	F	270

F – Fêmea. M – Macho. ND – Não definido. AB – Armação de Búzios. AC – Arraial do Cabo. CF – Cabo Frio. AR – Araruama. QU – Quissamã. CT – Comprimento total.

Portanto, o número total de amostras músculo, fígado, rim para cada espécie foi:

- Toninha – 8 músculos, 5 fígados e 1 rim;
- Golfinho-de-dentes-rugosos – 10 músculos, 8 fígados e 3 rins.

3.4. Extração das diferentes frações celulares das amostras

O procedimento de extração da MT foi realizado de acordo com o método de Erk *et al.* (2002), com adaptações. Para a extração das metalotioneínas, foram pesados 150 mg de cada amostra liofilizada em micro-tubos de polipropileno estéreis com capacidade para 2 mL, que foram homogeneizados por exatos 4 minutos manualmente com uma espátula utilizando 1.300 µL de uma solução tampão Tris-HCl em pH 8,6, contendo fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) como inibidor de protease e β-mercapoetanol como agente redutor. Subsequentemente, as amostras centrifugadas à 20.000 x g e 4 °C durante 60 minutos em uma centrífuga Eppendorf (model 5430R, Eppendorf, São Paulo). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para outros micro-tubo com capacidade para 2 mL e aquecidos em uma chapa (model IT-2002H, Bioplus, São Paulo) a 70 °C durante 10 minutos, e a fração insolúvel das amostras que permaneceu nos microtubos originais foi separada. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas novamente à 20.000 x g e 4 °C, desta vez por 30 minutos. Os sobrenadantes foram outra vez transferidos para novos micro-tubos, sendo assim separados dos novos precipitados formado a partir da degradação de proteínas e enzimas não-estáveis termicamente. Ao final do processo, as amostras foram congeladas em ultra-freezer a -80 °C para que não houvesse degradação do material biológico antes da análise.

Portanto, as frações sub-celulares separadas para análise foram: a fração insolúvel (PPT), composta por todos os precipitados gerados durante o primeiro processo de centrifugação, a fração termolábil (FTL), que é o sobrenadante obtido após a primeira centrifugação, antes do aquecimento, e a fração termoestável (FTE), que é o sobrenadante final obtido após o aquecimento e a segunda centrifugação, onde se encontra a metalotioneína purificada. Todas as soluções utilizadas na extração da MT foram preparadas com água ultra-pura (resistividade > 18 MΩ cm).

3.5. Determinação de metalotioneína (MT) na fração subcelular termoestável

A quantificação das metalotioneínas totais foi realizada utilizando a reação de Ellman (1959), no qual alíquotas de 50 μL de amostra proveniente da FTE foram adicionados com 50 μL de uma solução contendo 49,3 μL HCl 1 mol L^{-1} e 5 mL de EDTA 4 mmol L^{-1} , 1400 μL de uma solução contendo 50 mL NaCl 0,2 mol L^{-1} , 0,017 g de 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 0,43 mmol L^{-1}) e 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol L^{-1} a pH 8,0. Após mistura em homogeizador tipo vórtex, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos e posteriormente levadas a um espectrofotômetro UV-Vis (JASCO, V-530) para que fossem medidas as absorvâncias no comprimento de onda de 412 nm. A quantificação das MT foi realizada com uma curva analítica usando Glutathiona Reduzida (GSH) como padrão externo, pois esta apresenta semelhança estrutural com as MT, e é significativamente mais barata que um padrão de MT. Para estimar os níveis de MT assume-se 1 mol MT = 20 mol GSH (Kagi, 1999).

3.6. Extração e determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

O procedimento de extração da GSH se baseou no protocolo de Beutler (1975) com alterações por WILHELM-FILHO (2005). Para essa extração foram utilizados 200 mg de amostra liofilizada em micro tubos de 2 mL, que foram homogeneizadas com por exatos 4 minutos com uma espátula, utilizando 1.300 μL de uma solução contendo tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} em pH 6,5, sacarose 0,25 mol L^{-1} e EDTA 1 mmol L^{-1} . As amostras foram então centrifugadas em centrífuga Eppendorf (model 5430R, Eppendorf, São Paulo) a 11.000 x g e 4 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos micro-tubos e congelados em ultra-freezer a -80 $^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

A quantificação de GSH foi realizada utilizando 50 μL de amostra, 300 μL de água pura 350 μL de uma solução contendo 0,005 g de DTNB (0,25 mol L^{-1}) em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} em pH 8,0. Subsequentemente, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz por 15 minutos e suas absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de 412 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (JASCO, V-530). Este método também utilizou uma curva analítica com padrão externo de GSH.

3.7. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas através do método de Lowry modificado por Peterson (1997). Para isso, foi preparada uma solução de sulfato de cobre 1 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 2 % (m/v), carbonato de sódio 10 % (m/v), hidróxido de sódio 800 mmol L⁻¹ e dodecil sulfato de sódio 10 % (m/v), que misturadas resultam no Reativo A. As proteínas totais foram dosadas nas soluções obtidas após o procedimento de extração de MT (FTE) das amostras de fígado, músculo e rim de golfinhos.

Para a quantificação, foram utilizadas alíquotas de 10 µL das amostras. Para cada amostra e ponto da curva foram adicionados 400 µL de uma solução de sulfato de cobre 1 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 2 % (m/v), carbonato de sódio 10 % (m/v), hidróxido de sódio 800 mmol L⁻¹ e dodecil sulfato de sódio 10 % (m/v). Os microtubos foram agitados manualmente e deixados descansando por 10 min e posteriormente foram adicionados 200 µL de uma solução de Follin-Ciocalteau diluída 5 vezes com água ultra-pura. As soluções foram deixadas ao abrigo da luz por 30 min e, em seguida, foi realizada a leitura da absorvância das amostras e da curva de calibração no comprimento de onda de 750 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (JASCO, V-530). A curva analítica utilizada foi construída com padrão externo de Albumina Bovina Sérica (BSA).

3.8. Quantificação de elementos nas frações subcelulares das amostras de golfinho

As frações PPT, FTL, FTE e o DORM-4 (NRC, Canada), uma proteína de peixe utilizada como material de referência certificado para análises de elementos traço em animais aquáticos foram submetidos a uma digestão ácida utilizando 1,0 mL de ácido nítrico bidestilado (Vetec, Rio de Janeiro) para cada 150 mg de amostra, a 100 °C por 4 horas em tubos de polipropileno de 15 mL fechados. Após um período de resfriamento, todas as amostras tiveram seu volume ajustado para 10 mL com água ultra-pura (resistividade > 18 MΩ cm).

A quantificação dos metais e metalóides foi realizada em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, modelo Nexlon 300X (ICP-MS, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) sem uso de célula de reação, utilizando o ¹⁰³Rh como padrão interno a uma concentração de 20 µg L⁻¹. A introdução de amostra no plasma foi realizada por um sistema composto de nebulizador tipo Meinhard com câmara *twister*.

Foram preparadas soluções do branco das amostras, com o objetivo de detectar qualquer contaminação ao longo do processo analítico que impossibilitasse a detecção e a quantificação. As curvas analíticas foram preparadas utilizando padrões multielementares PerkinElmer. As concentrações da curva variaram de 1 a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Devido ao fato de alguns elementos apresentarem mais de um isótopo e, alguns destes sofrerem interferências, foram utilizados os isótopos ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{82}Se , ^{114}Cd , ^{202}Hg e ^{208}Pb , de modo a minimizar tais interferências, dado que a célula de reação não foi utilizada. As condições do ICP estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 . Condições operacionais do ICP-MS para a análise de metais

Condições do ICP-MS	
Potência de radiofrequência	1100 W
Vazão do gás plasma	17,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás carregador	1,04 L min ⁻¹
Amostrador e skimmer	Pt
Varreduras por leitura	1
Leituras por replicate	1
Número de replicatas	5
Dwell time	50 ms por isótopo
Isótopos monitorados	^{27}Al , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{82}Se , ^{107}Ag , ^{114}Cd , ^{197}Au , ^{202}Hg , ^{208}Pb , ^{47}Ti , ^{118}Sn

3.9. Identificação de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS

Após extraídas, 20 μL da FTE de cada amostra foram injetados em um HPLC (Shimadzu) acoplado a um ICP-MS, modelo Nexlon 300X (ICP-MS, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), cujas condições estão descritas na Tabela 4. Para que fosse possível comparar as intensidades relativas dos picos, foi injetada a mesma quantidade de proteína totais (40 μg), de cada amostra.

Tabela 4. Condições operacionais para as análises por SEC-HPLC-ICP-MS

Condições SEC	
Coluna cromatográfica	Superdex™-75 (10x300x13) mm (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
Faixa de resolução efetiva	3-70 kDa
Fase móvel	Tris-HCl 20 mmol L ⁻¹ (pH 7,4)
Vazão	0,7 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Condições ICP-MS	
Potência de radiofrequência	1.100 W
Vazão do gás plasma	17,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás carregador	1,04 L min ⁻¹
Amostrador e skimmer	Pt
Dwell time	28 ms por isótopo
Isótopos monitorados	²⁰⁸ Pb, ²⁰² Hg, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ¹¹⁴ Cd, ⁷⁵ As, ⁸² Se, ¹⁹⁷ Au, ⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁵⁷ Fe, ⁴⁷ Ti, ¹¹⁸ Sn

A calibração da coluna foi realizada com Albumina Bovina Sérica (BSA) (67 kDa, determinação de Zn), MT-I (7kDa determinação de Cd) e GSH (0,3 kDa determinação de Cu) (Garcia-Sevillano *et al.*, 2012).

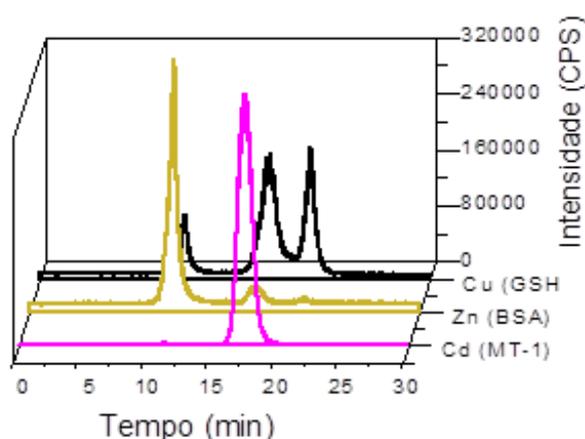


Figura 6. Calibração da coluna Superdex™-75

3.10. Parâmetros de mérito

Para avaliar cada método utilizado, foram calculados o limite de detecção (LD), que é a menor concentração de analito que pode ser detectada nas amostras, o limite de quantificação (LQ), que é a menor concentração de analito que pode ser quantificada na amostra e o coeficiente de variação, de acordo com as equações abaixo:

$$LD = (3 \cdot SD \cdot fd) / \text{inclinação da reta} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = (10 \cdot SD \cdot fd) / \text{inclinação da reta} \quad \text{Equação 2}$$

nas quais SD é o desvio padrão da medida da razão sinal do analito pelo sinal do padrão interno de 10 soluções do branco preparadas de maneira e fd é o fator de diluição da amostra. Foram avaliados o coeficiente de correlação da curva analítica ($r \geq 0,999$) e, no caso dos metais, o percentual de recuperação do material de referência (Inmetro, 2016; Ishak, 2015).

3.11. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas referentes aos dados de metais, metalóides, MT e GSH nos tecidos das espécies estudadas, a normalidade dos dados foi primeiro testada utilizando o teste W de Shapiro-Wilkes. Após a verificação da distribuição não-normal dos dados, foram realizados testes não paramétricos. Diferenças entre os parâmetros foram avaliados através do teste de Mann-Whitney, e correlações foram avaliadas através do teste de Spearman. As diferenças e correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software GraphPad Prism®. Os gráficos foram plotados utilizando o Excel® e o OriginPro®.

4. Resultados e discussão

Todas as amostras de fígado, rim e músculo, para ambas as espécies, foram submetidas a extração de MT e GSH. As concentrações de metais subcellulares, MT e GSH foram quantificadas em todas as amostras, além de todas terem sido submetidas a detecção por HPLC-ICP-MS.

4.1. Quantificação da MT e da GSH

Nas curvas analíticas utilizadas para a quantificação da MT obteve-se um R^2 sempre maior do que 0,992 para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*, o que, de acordo com Miwa, Falco e Calijuri (2008) é considerado adequado para a quantificação deste tipo de amostra. Os limites de detecção e quantificação para as análises de MT e GSH dessas espécies se encontram na Tabela 5 e todos os valores encontrados para as concentrações nas amostras estavam acima destes limites.

Tabela 5. Limite de detecção, em $\mu\text{mol g}^{-1}$, para as análises de MT e GSH para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

	MT	GSH
LD ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	114	0,08

As concentrações de MT encontradas em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei* e *S. bredanensis* estão expressas na Figura 7, em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco.

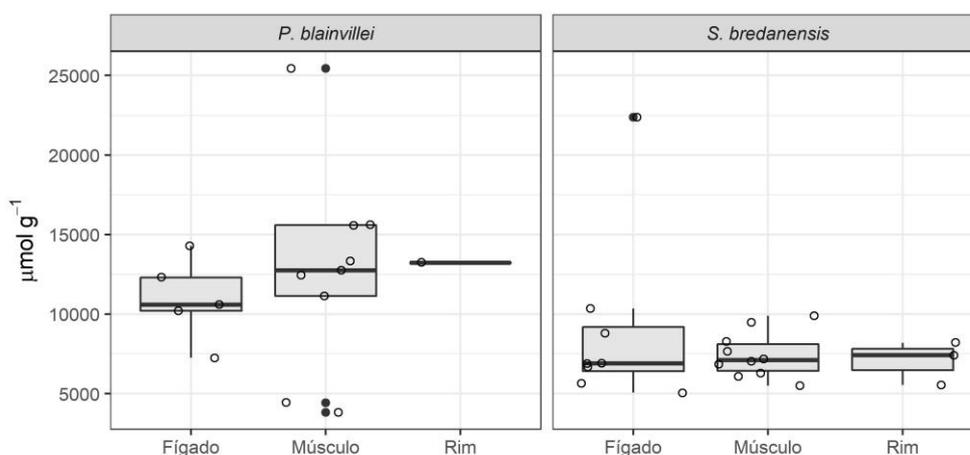


Figura 7. Concentrações de MT para (a) *P. blainvillei* (Fígado=5; rim=1; músculo=8) e (b) *S. bredanensis* (Fígado=8; rim=3; músculo=10)

As concentrações de MT variaram entre 7255 e 14.285 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para fígado e, 4425 e 25443 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para músculo para a *P. blainvillei*, enquanto para *S. bredanensis* essas concentrações estão entre 5056 e 22368 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para fígado, 5542 e 8203 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para rim e 5490 e 9899 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para músculo. Não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de MT no fígado e músculo, sendo que não foi possível testar diferenças significativas para o rim uma vez que só foi utilizada uma amostra para *P. blainvillei*. Já para *S. bredanensis* não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de MT nos três tecidos estudados. Alguns estudos indicam que a presença de MT é um indicio do processo de destoxificação no organismo (Yoshida *et al.*, 1999) e que sua indução é maior em tecidos ou órgãos envolvidos nos processos de captação, acúmulo e excreção de xenobióticos, como o fígado e o rim (Filipovi, 2003). No entanto, de acordo com Kehrig e colaboradores (2016) não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações desta metaloproteína em fígado e músculo de *P. blainvillei* em um estudo conduzido na mesma região Norte Fluminense e, uma vez que a quantidade de MT no músculo não foi significativamente maior que no fígado, postula-se que não ocorreu bioacumulação de metais nestes animais e que a excreção destes contaminantes se deu de forma eficiente.

Neste estudo, as concentrações de MT no músculo são semelhantes às do fígado, estando desta forma elevadas, indicando que nem todas as rotas de destoxificação exercidas pelos indivíduos são eficientes, dado que, caso o fossem, ocorreria a excreção maior da MT pelo fígado. Este, por sua vez, é considerado um órgão metabolicamente ativo, sendo efetivamente responsável pelos processos de destoxificação, o que deveria levar à excreção de contaminantes, e não seu acúmulo no músculo, dado que este não é um tecido biologicamente ativo (Nogueira, 2016).

Já para GSH, as concentrações verificadas no fígado, rim e músculo das espécies estudadas estão expressas na Figura 8, em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco.

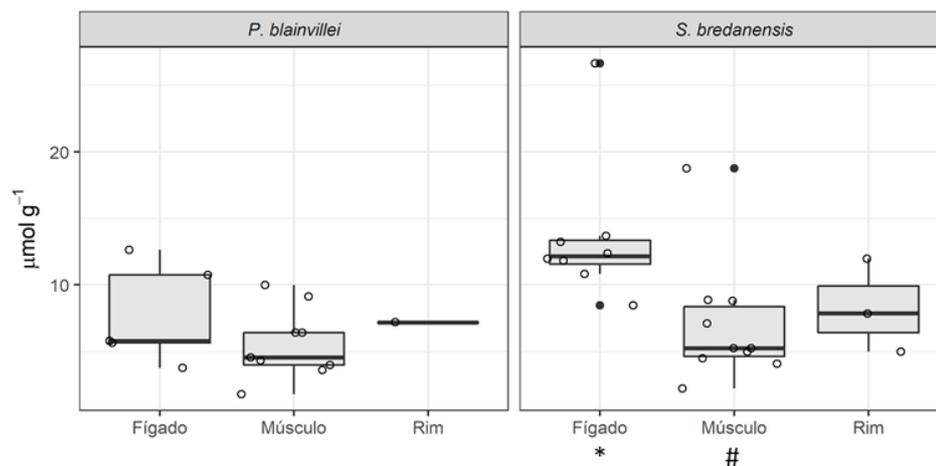


Figura 8. Concentrações de GSH para (a) *P. blainvillei* (Fígado=5; rim=1; músculo=8) e (b) *S. bredanensis* (Fígado=8; rim=3; músculo=10). * e # indicam diferenças significativas entre os tecidos.

As concentrações de GSH variaram entre 3,76 e 12,64 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para fígado e, 1,78 e 9,99 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para músculo para a *P. blainvillei*, enquanto para *S. bredanensis* essas concentrações estão entre 8,45 e 13,69 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para fígado, 4,97 e 11,98 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para rim e 2,21 e 18,76 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para músculo. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tecidos e órgãos analisados para a *P. blainvillei*. Já para *S. bredanensis* foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de GSH do fígado e do músculo, indicando que o estresse oxidativo no fígado é muito maior que no músculo. Isto, porém, é esperado, devido aos níveis metabólicos mais altos do fígado. De acordo com Srikanth *et al.* (2013) a presença de metais e metalóides pode afetar os níveis de GSH de diferentes formas, sendo que a atividade da GSH pode variar também dependendo do tecido, espécie estudada, elementos e nível de contaminação.

A GSH apresenta um papel importante na defesa celular, uma vez que está envolvida em mecanismos que combatem o estresse oxidativo celular resultante da presença de elementos traço e pode ser considerada como protetor antioxidante para mamíferos marinhos (Kehrig, *et al.*, 2016).

Há estudos que indicam a existência de diferença significativa de concentração de GSH em fígado e músculo de *P. blainvillei* (Kehrig, *et al.*, 2016), no entanto, este não foi o caso no estudo realizado.

Com relação a correlações estatísticas, não foram observadas correlações de Spearman entre MT e GSH. Isto indica que a GSH está atuando no seu papel principal de remoção de espécies reativas de oxigênio das células, não apresentando função na destoxificação de metais nos organismos analisados.

4.2. Quantificação de metais e metalóides

Os metais e metalóides foram quantificados em 3 frações subcelulares: PPT, também conhecida como fração insolúvel, que não é capaz de causar efeitos deletérios ao organismo, FTL, a fração termolábil, e FTE, a fração termoestável, sendo as duas últimas frações solúveis e nas quais carga metálica nelas encontrada pode ser prejudicial ao organismo.

4.2.1. Parâmetros de mérito

Os metais avaliados nesse estudo foram: Ag, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ti e Zn e seus limites de detecção e quantificação do método, ou seja, em mg de analito por kg de amostra, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Limites de detecção, em mg kg⁻¹, para a quantificação de metais por ICP-MS

Elemento	LD (mg kg ⁻¹)
Ag	0,004
Al	0,04
As	0,004
Cd	0,0005
Cr	0,06
Cu	0,008
Fe	0,26
Hg	0,007
Mn	0,001
Ni	0,004
Pb	0,001
Se	0,03
Sn	0,003
Ti	0,03
Zn	0,05

A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência (DORM-4). Para tal, o mesmo foi preparado e analisado a cada batelada de amostras e suas concentrações obtidas foram comparadas com os valores certificados. A média e desvios das concentrações medidas de cada elemento podem ser observados na Tabela 7. As concentrações medidas foram entre 90,5 e 107 % dos valores certificados sendo, portanto, considerados adequados.

Tabela 7. Concentrações e recuperações do material certificado (DORM-4).

Elemento	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor obtido (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
As	6,80 ± 0,64	7,03 ± 0,36	103,3
Cd	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,03	92,1
Cu	15,9 ± 0,9	14,5 ± 0,9	91,5
Hg	0,41 ± 0,06	0,44 ± 0,07	107
Ni	1,36 ± 0,22	1,23 ± 0,07	90,5
Se	3,56 ± 0,34	3,83 ± 0,65	107,6
Zn	52,2 ± 3,2	50,7 ± 3,2	97,2

4.2.2. Distribuição subcelular de metais em *Pontoporia blainvillei*

Para facilitar a discussão, foram determinadas as concentrações nas frações insolúvel (PPT), termolábil (FTL) e termoestável (FTE) e, subsequentemente foram calculadas as porcentagens em cada fração em relação ao valor total. Os elementos foram divididos em 3 figuras: A Figura 9 apresenta as distribuições subcelulares de Ag, Al, As, Cd, Cr e Cu, e a Figura 10 as distribuições de Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Se e a Figura 11 as distribuições de Sn, Ti e Zn.

Verificam-se diferenças inter-elementais com relação à solubilidade e à presença dos elementos analisados nas três frações (PPT, FTL e FTE), o que por sua vez, indica biodisponibilidade celular destes elementos, uma vez que todos apresentam alguma concentração em FTL ou FTE. A partir dos diferentes padrões nas distribuições subcelulares é possível inferir sobre diferenças em rotas de detoxificação, além de diferenças inter-individuais.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) observadas no fígado foram para as concentrações de As, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Ti e Zn entre PPT e FTE, já o Fe

apresentou diferença significativa de concentração entre as três frações e Se entre as frações PPT e FTL assim como para PPT e FTE.

Não foi possível testar se existem diferenças significativas na amostra de rim, uma vez que apenas um exemplar deste órgão foi analisado.

No músculo, os metais Al, As, Cd, Cr, Mn e Sn apresentaram diferenças significativas de concentração entre as PPT e FTL, enquanto Cu, Hg, Se e Zn apresentaram diferenças significativas tanto entre PPT e FTL quanto entre PPT e FTE. Os analitos Fe, Ti apresentaram diferenças significativas entre as três frações e Ni apresentou diferença significativa apenas entre PPT e FTE.

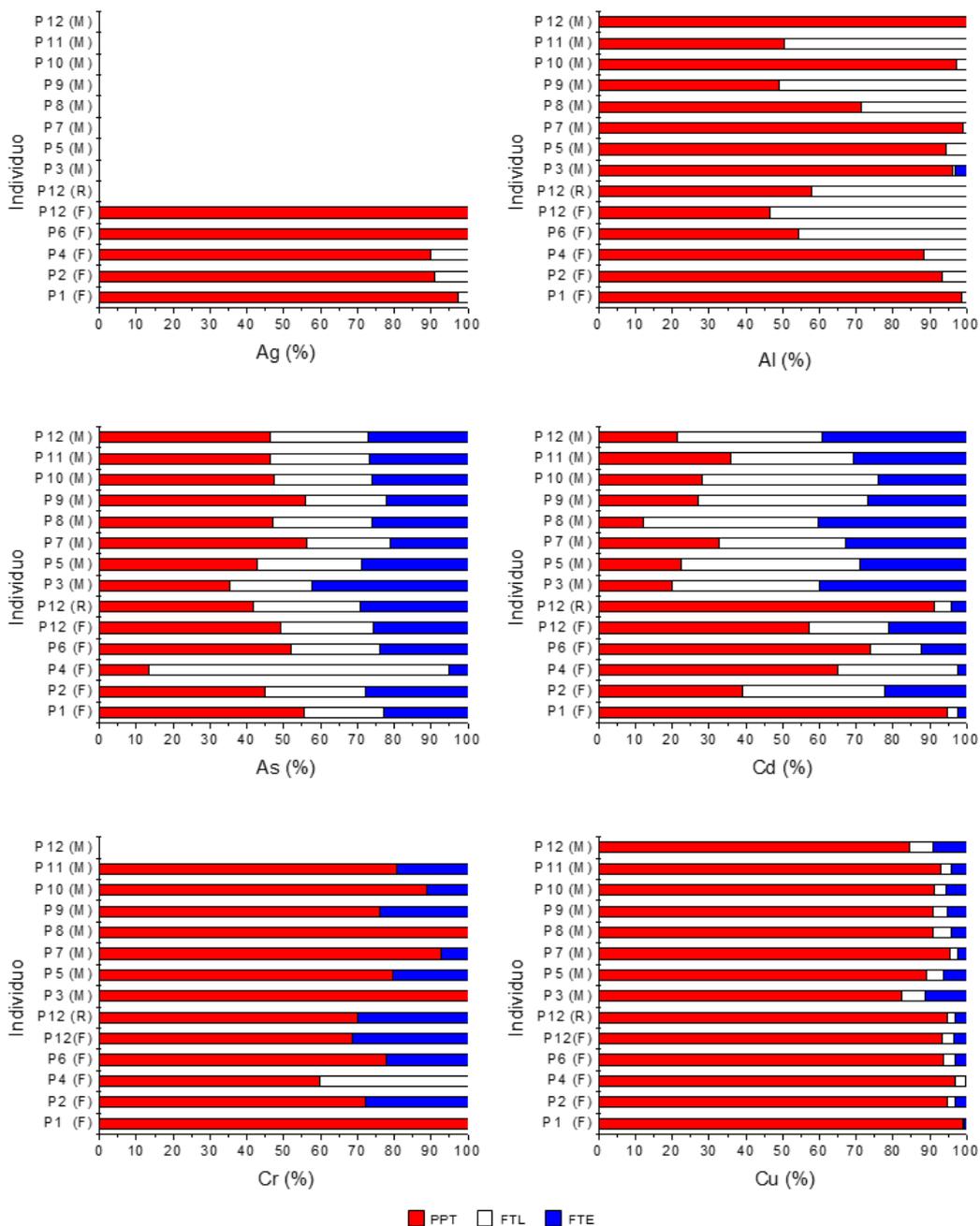


Figura 9. Distribuição subcelular para Ag, Al, As, Cd, Cr e Cu nas amostras de *P. blainvillei*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

Para Ag é visto que somente nas amostras de fígado de *P. blainvillei* o mesmo foi quantificável e, analisando a distribuição subcelular deste analito, é observável que pelo menos 90 % da concentração total de Ag encontrada está em PPT, estando assim indisponível biologicamente no organismo e, conseqüentemente, não apresentando efeitos deletérios à saúde do indivíduo estudado. As baixas concentrações de Ag na fração FTE indicam que os mecanismos de destoxificação através da MT não são eficientes (Decataldo *et al*,

2004). Estudos conduzidos por Nakazawa e colaboradores (2011) sugerem que Ag pode formar complexos com Se e S em mamíferos marinhos, uma vez que eles encontraram Ag_2Se em fígado de *P. blainvillei* e Ag_2S em fígado de *Orcinus orca* (baleia Orca).

Analisando o Al, podemos observar que os indivíduos P6 (F), P12 (F), P9 (M) e P11 (M) apresentam em torno de 50 % de sua concentração total na fração PPT e os outros 50 % na fração FTL. Uma vez que fração FTE apresenta concentrações abaixo do LD ou LQ é possível que a MT não desempenhe papel significativo nos processos de destoxificação desses animais. No entanto, uma vez que as amostras estavam liofilizadas, é indicativo de que a destoxificação desses animais é provavelmente realizada por proteínas ou outros compostos não enzimáticos, pois a remoção de água das amostras degrada a conformação quaternária de enzimas, com conseqüente perda de atividade enzimática e soltura de íons da estrutura molecular, que iriam para a fração PPT e não FTE (Pisano *et al.*, 2013). Nos outros indivíduos a proporção entre as frações PPT e FTL diminui progressivamente, de forma que é possível inferir uma menor eficiência nos processos de destoxificação e observar um maior acúmulo de Al no organismo desses animais.

Para o As podemos concluir que sua destoxificação ocorreu de maneira significativa, diferente do que foi majoritariamente observado para Ag e Al, uma vez que a concentração deste analito em PPT varia de 40 a 60 %. Todos os indivíduos, exceto P4 (F), apresentaram pelo menos 20 % da concentração total de As em FTE, indicando que, pelo menos uma parte da destoxificação destes indivíduos, foi realizada pela MT, embora a percentagem em FTL indique que, para a maior parte dos indivíduos, a maior parte da destoxificação é realizada por proteínas ou outros compostos não enzimáticos. O indivíduo P3 (M) apresenta maior concentração percentual de As em FTE, indicando uma maior capacidade de destoxificação mediada por MT devido à alta concentração proporcional de As nesta fração. Outro indivíduo que se destaca é o P4 (F), uma vez que este apresenta uma concentração proporcional em PPT e FTE menor que 20 %, indicando que a destoxificação ocorreu de forma eficiente neste animal, sendo assim observado um baixo acúmulo de metal. No entanto, a destoxificação é realizada por proteínas ou outros compostos não enzimáticos, uma vez que a concentração percentual de As em FTL é superior a 60 %.

Para o Cd em *P. blainvillei* vemos que, percentualmente, o acúmulo deste metal essencial em músculo é menor do que em rim e fígado. No músculo, entre 20 e 40 % de Cd está acumulado em PPT, indicando que apenas esta parte do

total acumulado não esteve biologicamente disponível e conseqüentemente não foi capaz de causar efeitos adversos no organismo. Dessa forma temos que pelo menos 60 % do total de Cd que foi absorvido estava biologicamente disponível e este foi destoxificado pela MT, presente na FTE, juntamente com outras proteínas e compostos não-enzimáticos presentes em FTL. Uma vez que a destoxificação e excreção são majoritariamente realizadas pelo fígado e rim, é esperado que houvesse um acúmulo de metais não-essenciais nestes órgãos (Elliott, Griffiths e Taylor, 1988). O Cd é conhecido por sua grande afinidade com MT, de modo que é possível observar grandes proporções deste analito em FTE e, também por este fato, podemos assumir que a destoxificação deste ocorreu, ao menos parcialmente, por esta via metabólica (Rafique, Shaikh e Tahir, 2010).

Em relação às distribuições subcelulares de Cr e Cu, em sua grande maioria, os indivíduos analisados apresentaram a maior parte da concentração de Cr e Cu na fração insolúvel, desta forma não estando biologicamente disponível. É possível observar que a destoxificação de Cr ocorreu quase exclusivamente pela atuação da MT, uma vez que apenas o indivíduo P4 (F) apresentou concentração acima do LQ para Cr na fração FTL. No entanto, ainda assim é possível observar um acúmulo significativo em todos os órgãos e tecido analisados, devido à alta concentração percentual encontrada em PPT. Nas frações solúveis, o Cu apresenta uma concentração percentual baixa, indicando que, para este metal, ocorreu um processo de destoxificação. De acordo com a literatura (Waalkes *et al*, 1984), a MT tem uma alta afinidade com cobre, no entanto neste estudo foi observada uma quantidade muito pequena de Cu em FTE, em relação à concentração total. Para ambos os analitos, a grande proporção de metal em músculo indica que os indivíduos sofreram bioacumulação (Souza *et al.*, 2018).

Na Figura 10, a distribuição subcelular de Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Se é ilustrada para *P. blainvillei*

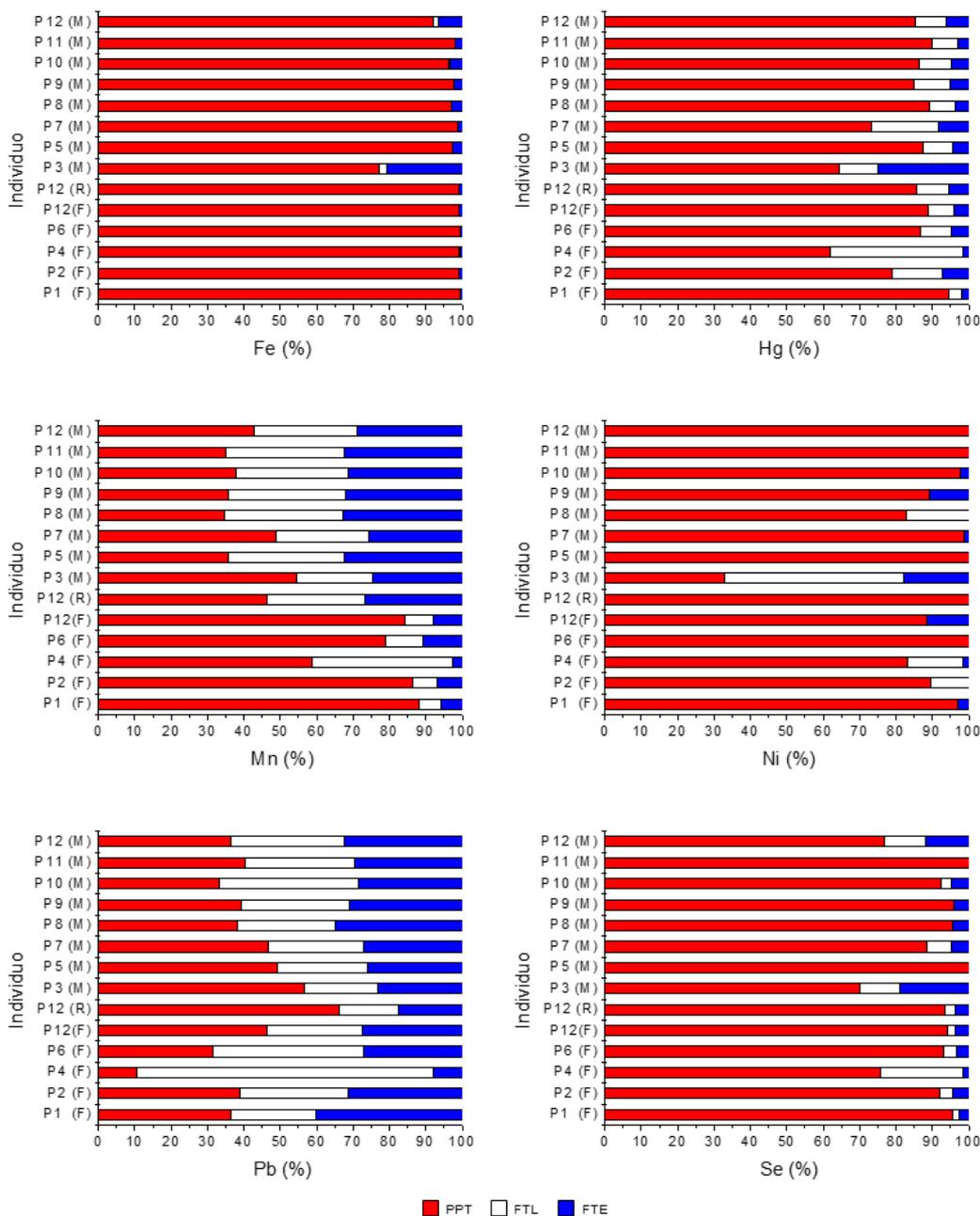


Figura 10. Distribuição subcelular para Fe, Hg, Mn, Ni Pb e Se nas amostras de *P. blainvillei*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

O comportamento do Fe é muito similar ao do Cu, mostrado anteriormente na Figura 9, em sua grande maioria é observado o acúmulo em PPT e alguma destoxificação mediado por MT. O indivíduo P3 (M) é o que apresenta maior concentração proporcional de Fe, em torno de 20% de sua concentração total nesta fração, tendo sido destoxificado por MT.

Já para Hg é observado um comportamento variado entre os diferentes animais. Assim como a maioria os metais estudados até este momento, a maior parte de sua concentração percentual se encontra em PPT, indicando que a maior parte das concentrações deste elemento não está biologicamente disponível e conseqüentemente não é capaz de causar efeitos tóxicos à biota, assim como reportado por Decataldo e colaboradores (2004). Alguns indivíduos como P3 (M) merecem destaque, uma vez que este apresenta, junto com o P4 (F), a maior proporção de destoxificação entre as amostras. O P3 (M) apresenta também o maior percentual de destoxificação mediada pela MT entre todos os indivíduos para esse metal, enquanto a para o P4 (F) o processo de destoxificação é quase que exclusivamente mediado por proteínas e compostos não enzimáticos que não são resistentes a temperaturas elevadas.

Para Pb há uma distribuição muito parecida com as de As e Cd, previamente mostrada na Figura 9, assim como com Mn (Figura10). As taxas de acúmulo em PPT são bastante variadas, abrangendo valores entre 10 e 70 %. Também é possível observar que para este analito, no geral, é verificada uma boa destoxificação, uma vez que, tanto a FTL quanto a FTE estão apresentando altas proporções de metais. O indivíduo P1 (F) é o que apresenta maior concentração proporcional em FTE, ou seja, maior destoxificação mediada por MT, enquanto P4 (F) é o que apresenta maior concentração em FTL.

A distribuição de Se, por outro lado, é muito similar à de Cu, apresentando, assim, altas taxas de analito em PPT e baixas taxas de destoxificação, uma vez que a concentração nas frações FTL e FTE é baixa. Os indivíduos que apresentam menor acumulação em PPT são P12 (M), P3 (M) e P4 (F), no entanto, o percentual de acúmulo é elevado.

A distribuição subcelular de Sn, Ti e Zn é ilustrada para *P. blainvillei* na Figura 11.

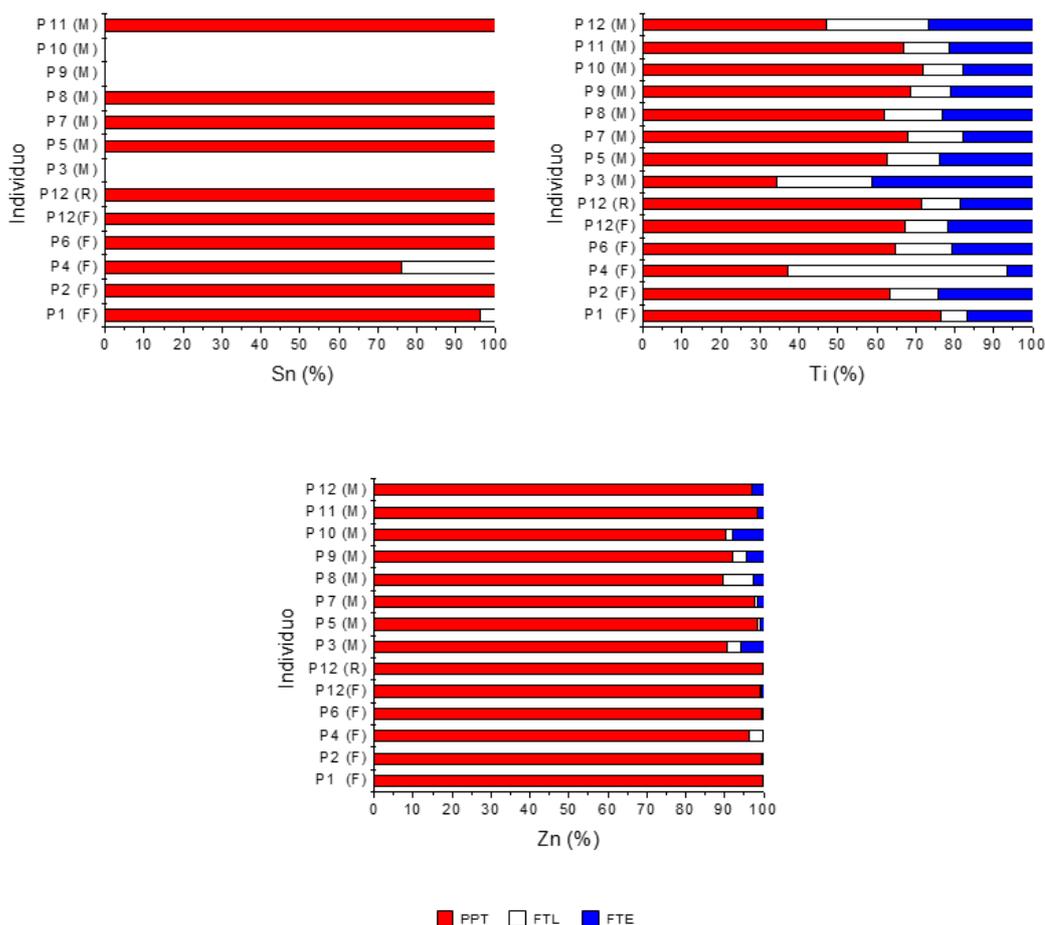


Figura 11. Distribuição subcelular para Sn, Ti e Zn nas amostras de *P. blainvillei*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

Assim como foi observado para Ag (Figura 9), praticamente não ocorreu destoxificação para Sn, com exceção dos indivíduos P4 (F) e P1 (F). Uma diferença entre Ag e Sn é que, para Sn, é observado acúmulo nos três tecidos analisados, enquanto Ag foi observado somente no fígado. O acúmulo de Sn em PPT no músculo é um indicativo de bioacumulação.

Similarmente ao As (Figura 9) e Pb (Figura 10), a distribuição intracelular de Ti apresenta um perfil muito heterogêneo, com concentrações percentuais em PPT variando entre 40 e 80 %. Todos os indivíduos analisados apresentaram alguma destoxificação na FTL e FTE, indicando que tanto a MT quanto outros compostos não enzimáticos auxiliaram nesse processo. O indivíduo P3 (M) apresenta em torno de 40 % de sua concentração total em FTE, sendo o indivíduo com maior proporção de destoxificação por MT, enquanto o indivíduo P1 (F) foi o que apresentou maior concentração proporcional em PPT.

O Zn, por sua vez, apresentou um comportamento similar ao Cu (Figura 9), mostrando baixos percentuais de concentração em FTL e FTE, ou seja, quase nenhuma destoxificação mediada por MT ocorreu nos indivíduos estudados.

O indivíduo P12 foi único a apresentar material suficiente para análise em todos os tecidos estudados. A distribuição dos metais analisados no organismo desse mamífero segue diferentes perfis, mostrando em PPT que Ag, As, Fe, Hg, Mn, Se e Sn têm um percentual de acumulação maior em fígado do que nos outros tecidos estudados. Sendo este o órgão principal nos processos de destoxificação de todos os vertebrados, é esperado que sejam encontrados nele as maiores concentrações de elementos, tanto não-essenciais quanto essenciais (Souza *et al.*, 2018). Por outro lado, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Sn, Ti e Zn apresentaram maior concentração percentual em rim, que, por ser um órgão filtrante, também acaba acumulando metais, assim como o fígado. No músculo, foi observado o acúmulo de Al e Ni, indicando a bioacumulação destes elementos.

Nas frações FTL e FTE foi observado que o músculo foi o tecido no qual ocorreu o maior acúmulo proporcional de metais. Em FTL, foi observado um maior percentual de Al e Zn no fígado e de As e Hg no rim, enquanto Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Se e Ti apresentaram maior concentração percentual no músculo. Comparando as frações FTE dos diferentes tecidos, Cr e Ni apresentaram maior concentração proporcional em fígado, As em rim e Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se, Ti e Zn em músculo. O maior acúmulo em músculo pode ser ocasionado por uma sobrecarga no rim e no fígado, uma vez que estes são os principais órgãos responsáveis por acúmulo e processamento de metais. Considerando que o músculo também produz MT e GSH, porém em menores quantidades do que o rim e o fígado, ele vai realizar a biotransformação dos xenobióticos nele acumulados, de modo que estes não sejam mais tóxicos. No entanto, a capacidade de excreção do músculo é reduzida, fazendo com que os contaminantes biotransformados fiquem acumulados nas células (Souza *et al.*, 2018).

4.2.2. Distribuição subcelular de metais em *Steno bredanensis*

Assim como para *P. blainvillei*, foram determinadas as concentrações nas frações isolável (PPT), termolábil (FTL) e termoestável (FTE) e, subsequentemente foram calculadas as concentrações percentuais em cada fração em relação ao valor total, para facilitar a discussão. Os elementos foram divididos em 3 figuras: A Figura 12 apresenta as distribuições subcelulares de Ag,

Al, As, Cd, Cr e Cu, e a Figura 13 as distribuições de Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Se e a Figura 14 as distribuições de Sn, Ti e Zn.

Assim como para *P. blainvlei* foram observadas diferenças inter-elementares, indicando assim que estes elementos estão biodisponíveis. Também foram observados padrões que possibilitam inferências sobre as possíveis diferenças em rotas de destoxificação, além de diferenças inter-individuais.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) observadas no fígado foram para as concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ti, Zn entre PPT e FTL, assim como entre PPT e FTE. Al apresentou diferenças significativas entre PPT e FTE.

Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes frações das amostras de rim, possivelmente devido ao baixo número de amostras. No músculo, os metais As, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se, Ti, Zn apresentaram diferenças significativas de concentração entre PPT e FTL, assim como entre PPT e FTE. Al, Cd e Ni apresentaram diferenças significativas entre PPT e FTE. Foram observadas diferenças significativas entre FTL e FTE para Cd e Fe.

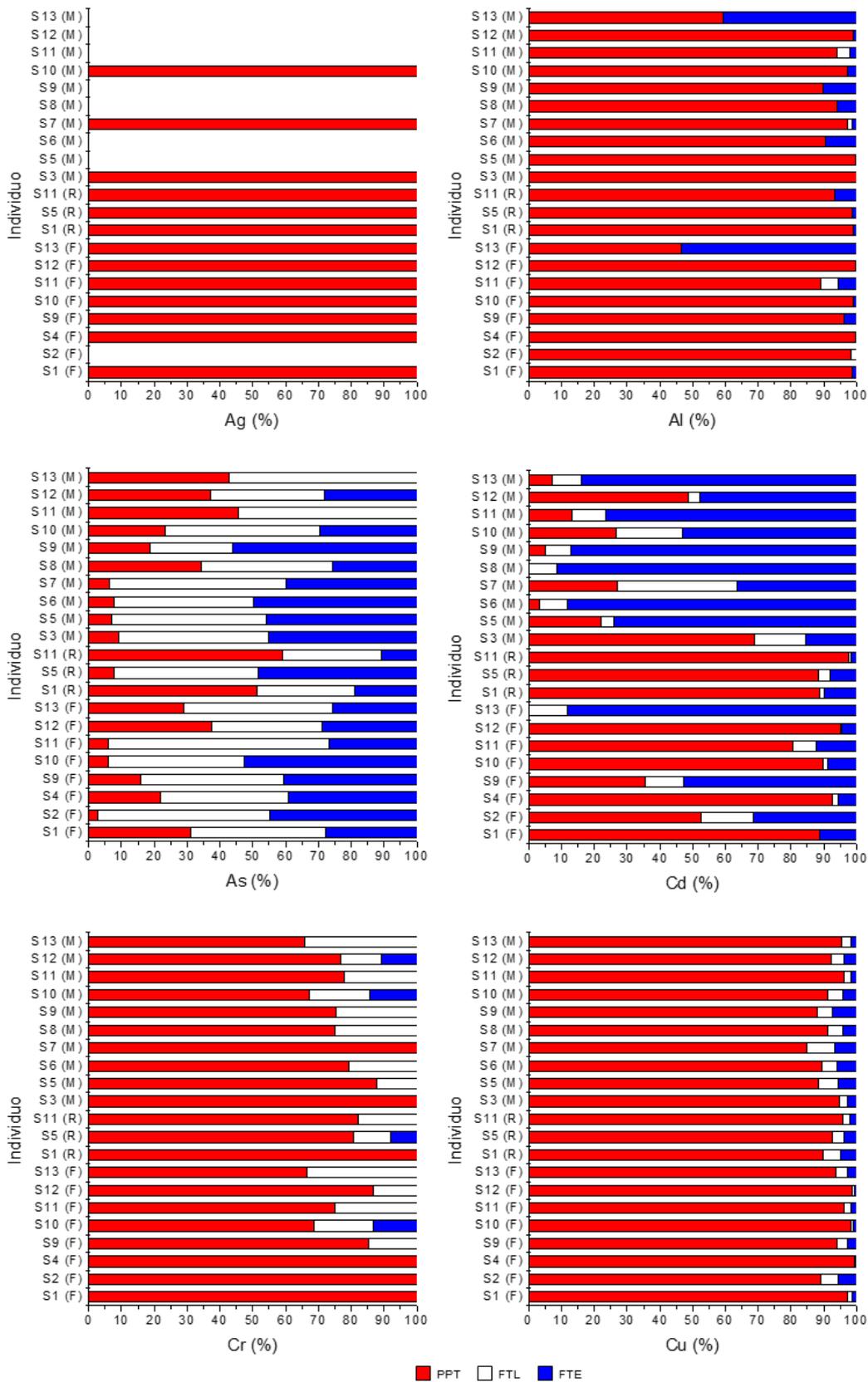


Figura 12. Distribuição subcelular para Ag, Al, As, Cd, Cr e Cu nas amostras de *S. bredanensis*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

A acumulação de Ag é observada majoritariamente no fígado e rim, uma vez que apenas três indivíduos apresentam concentração acima do LD ou LQ para Ag em músculo. Uma vez que as concentrações em FTL e FTE estão abaixo do LD ou LQ é possível inferir que não ocorreu destoxificação através da MT para este analito (Decataldo *et al*, 2004). Como mencionado anteriormente para *P. blainvillei*, Nakazawa e colaboradores (2011) mostraram que Ag é capaz de formar complexos com Se e S em mamíferos marinhos.

É possível observar, majoritariamente, uma acumulação de Al em todos os tecidos, assim como baixos níveis de destoxificação. Os indivíduos S13 (M) e S13 (F) são os que apresentam uma maior proporção de metais em FTE, indicando desta forma destoxificação mediada por MT. É possível inferir a bioacumulação de Al nestes (Decataldo *et al*, 2004).

Para As, podem ser verificados perfis variados entre os indivíduos. No geral é possível observar baixos níveis de acumulação de metais em PPT, indicando que, de modo geral, a maior parte do As está biodisponível. É possível observar a destoxificação mediada por compostos não enzimáticos em FTL e por MT em FTE. Os indivíduos S11 (M) e S13 (M) não apresentam destoxificação mediada por MT.

Assim como o As, a distribuição subcelular de Cd é bastante heterogênea. Em fígado e rim é observada, principalmente, a acumulação deste analito em PPT, exceto por S13 (F), que tem concentração de Cd abaixo do LD ou LQ. Os indivíduos que apresentam as maiores destoxificações são S2 (F), S3 (F) e S13 (F), todas majoritariamente realizadas pela MT. No músculo, as concentrações são bastante variadas entre os indivíduos, sendo que o indivíduo S8 (M) apresenta concentração de Cd abaixo do LD ou LQ. Na maior parte das vezes a destoxificação de Cd foi realizada por MT no músculo, sendo que esta também foi realizada por compostos não enzimáticos, especialmente em S7 (M). Os únicos indivíduos que apresentam concentração mais elevada de Cd em músculo são S3 e S12.

O acúmulo de Cr é majoritariamente observado em todos os tecidos e órgãos, assim como os baixos níveis de destoxificação. Apenas os indivíduos S10 (F), S5 (R), S10 (M) e S12 (M) apresentaram destoxificação mediada por MT e os indivíduos S1 (F), S2 (F), S3 (F), S3 (M) e S7 (M) não aparentam ter passado por nenhum processo de destoxificação por MT.

A distribuição subcelular de Cu mostra um comportamento bastante uniforme, sendo que a maior concentração deste metal está em PPT, indicando que, embora este não cause efeitos adversos à biota, é possível que esteja

ocorrendo bioacumulação, indicado pelas altas concentrações em músculo (Decataldo *et al*, 2004). Todos os indivíduos analisados apresentam concentração de Cu em FTL e FTE, indicando que, ao menos uma parte do mesmo, apresentou destoxificação mediada por MT.

Na Figura 13 é apresentada a distribuição subcelular de Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Se para *S. bredanesis*.

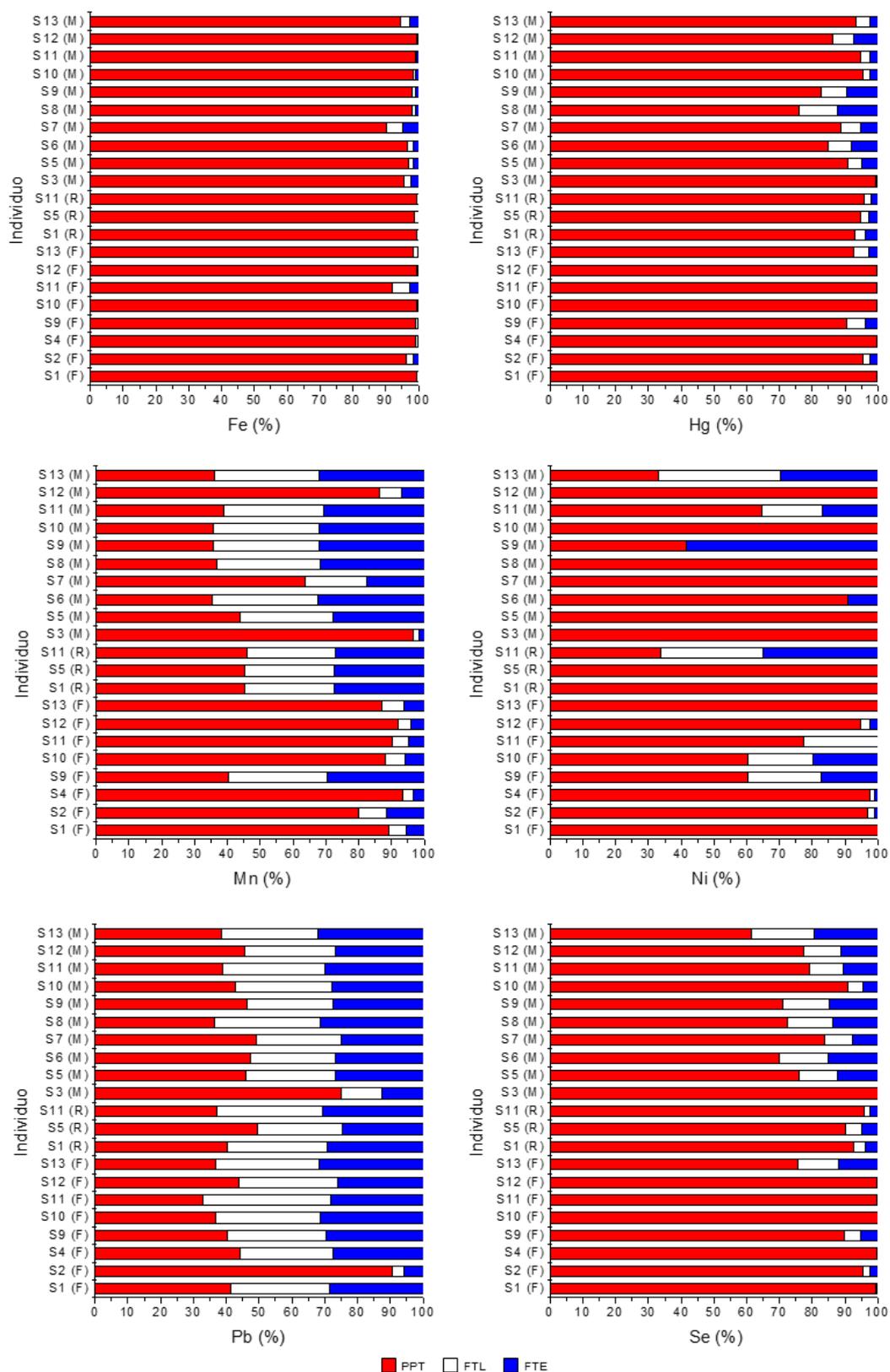


Figura 13. Distribuição subcelular para Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se nas amostras de *S. bredanensis*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

O perfil exibido pelo Fe é bastante uniforme, assim como para Cu. Neste é observado que uma maior concentração em PPT, indicando que pouca destoxificação está sendo realizada pela via metabólica da MT, de forma que este não está biodisponível e provavelmente não apresentou efeitos adversos ao organismo.

Para Hg é visto um grande acúmulo em todos os tecidos e órgãos analisados em PPT, semelhante ao que foi observado para Cu (Figura 14), no entanto, é observada uma maior percentagem de destoxificação neste caso. Os indivíduos S1 (F), S4 (F), S10 (F), S11 (F), S12 (F) e S3 (M) não apresentaram concentração significativa em FTL e FTE, de modo que estes não realizaram destoxificação. A alta percentagem de Hg em PPT de músculo indica que pode ter ocorrido bioacumulação (Decataldo *et al*, 2004).

As concentrações de Mn entre os tecidos e órgãos não são uniformes, diferente do que pode ser observado anteriormente para outros analitos. É verificado principalmente o acúmulo no fígado, sendo que o indivíduo S9 (F) é o que apresenta menor concentração proporcional em PPT e maior destoxificação mediada por MT. Em rim, os níveis de acumulação foram similares para os 3 indivíduos. Em músculo temos um menor acúmulo em PPT, exceto por S3 (M) e S12 (M). O menor acúmulo implica em uma maior destoxificação, mediada tanto por MT quanto por outros compostos não enzimáticos.

Assim como para Mn, a distribuição subcelular de Ni é bastante heterogênea, mostrando, para a maioria dos indivíduos, um perfil de acumulação em PPT e baixos níveis de destoxificação. Em fígado, os indivíduos S9 (F), S10 (F) e S11 apresentam uma maior proporção de Ni em FTL e FTE, sendo esses os indivíduos que realizaram mais destoxificação. Em rim, é observado o acúmulo deste analito, uma vez que as concentrações em FTL e FTE estavam abaixo do LQ, de forma que toda a concentração obtida está acumulada em PPT, exceto pelo indivíduo S11 (R), que apresenta a maior parte de sua concentração dividida entre FTL e FTE. A maioria dos indivíduos apresentam uma alta taxa de acumulação em PPT no músculo, sendo que apenas os indivíduos S6 (M), S9 (M), S11 (M) e S13 (M) aparentam exercer destoxificação mediada por MT ou outros compostos não enzimáticos.

A distribuição de Pb pode ser considerada bastante uniforme em todos os órgãos e tecidos estudados, com exceção de dois indivíduos, S2 (F) e S2 (M). No geral, é observado um certo acúmulo em PPT, no entanto a maior parte da concentração de todos os indivíduos está dividida entre FTL e FTE, indicando que a destoxificação por MT e por compostos não enzimáticos ocorreu.

Por outro lado, o perfil de distribuição subcelular de Se pode ser considerado heterogêneo. Em fígado e rim é observado majoritariamente o acúmulo de Se em PPT e níveis significativos de destoxificação apenas para S2 (F), S9 (F), S13 (F), S1 (R), S5 (R) e S11 (R). Em músculo, por outro lado, apenas o indivíduo S3 (M) não aparentou ter realizado alguma destoxificação, uma vez que as concentrações em FTL e FTE estavam abaixo do LD. Todos os outros indivíduos apresentaram alguma destoxificação para músculo mediada por MT ou compostos não enzimáticos. A Figura 14 mostra a distribuição subcelular para Sn, Ti e Zn para *S. bredanensis*.

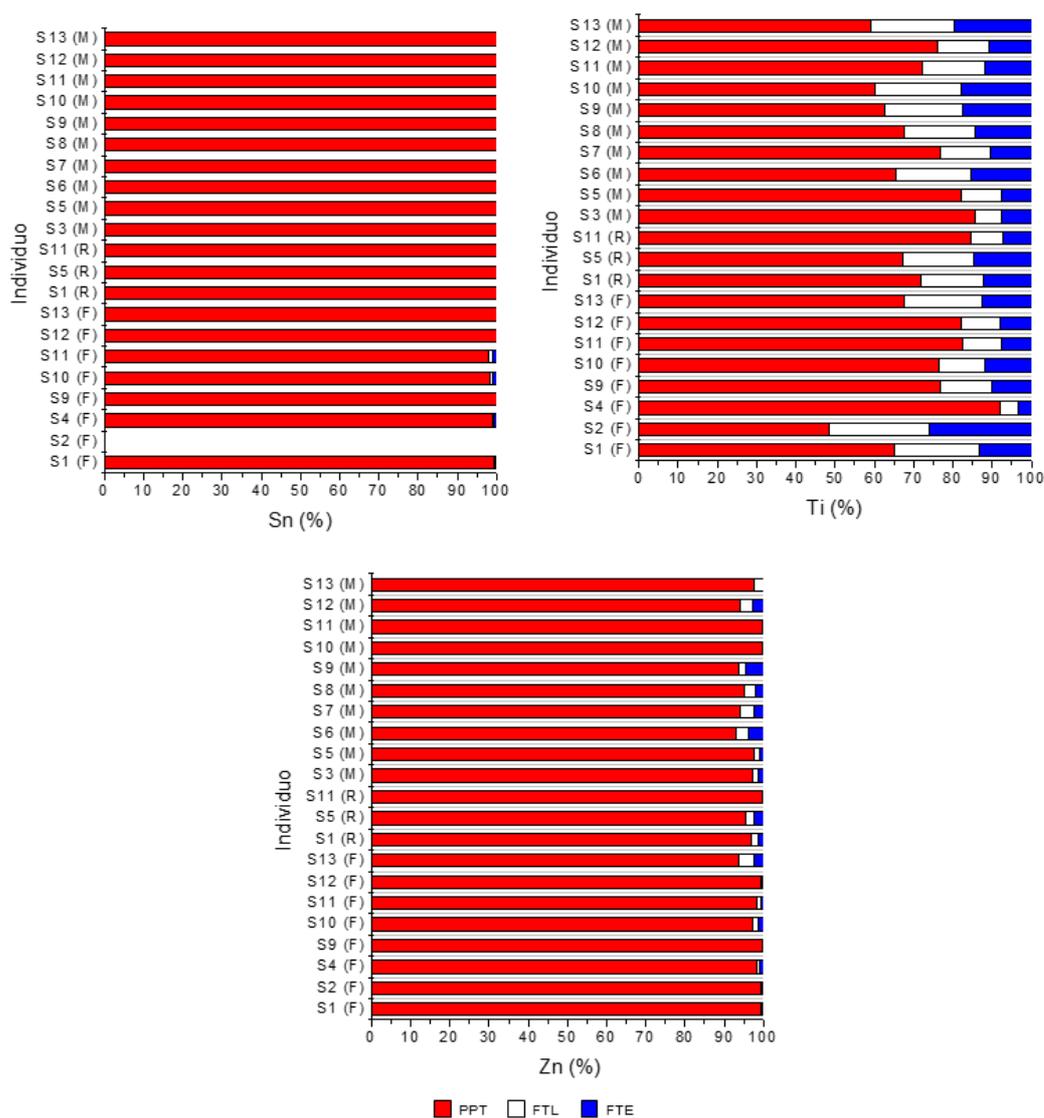


Figura 14. Distribuição subcelular para Sn, Ti e Zn nas amostras de *S. bredanensis*. (F) Fígado, (R) Rim, (M) Músculo.

No caso de Sn é observado, quase exclusivamente, a acumulação em PPT em todos os órgãos e tecidos. Alguma destoxificação pode ser observada em S4 (F), S10 (F) e S11 (F), o que seria esperado para todos os indivíduos, uma vez que o fígado é o principal órgão que realiza destoxificação no organismo. O acúmulo em músculo indica que os indivíduos analisados sofreram bioacumulação.

Para Ti, é observado que todos os órgãos ou tecidos realizaram alguma destoxificação, no entanto ainda assim é observado um acúmulo muito grande deste analito em PPT. No fígado, o indivíduo S2 (F) é o que aparenta ter realizado mais destoxificação, uma vez que apresenta as maiores concentrações em FTL e FTE.

Ainda de acordo com a Figura 18, a distribuição de Zn apresenta um grande acúmulo em PPT em todos os órgãos e tecidos, assim como um nível muito baixo de destoxificação. O alto acúmulo em fígado e rim indica que estes órgãos podem ter sido sobrecarregados e conseqüentemente não foram capazes de executar suas funções apropriadamente. O alto acúmulo em músculo, além de consequência direta da sobrecarga do rim e fígado, indica que pode ter ocorrido bioacumulação no organismo.

O indivíduo S11 foi único a apresentar material suficiente para análise em todos os tecidos estudados. Embora as concentrações de metais em cada um desses órgãos possam variar, a tendência observada é a mesma. Foi observado o acúmulo de Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Se e Zn em PPT hepático, e As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Se e Zn em PPT renal. Maiores concentrações de metais não-essenciais e essenciais nesses órgãos são esperadas, considerando que o fígado e o rim são os principais órgãos de desintoxicação e excreção em todos os vertebrados (Souza *et al.*, 2018). Os níveis elevados de Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se e Zn no músculo em PPT também refletem a bioacumulação desses elementos nesse indivíduo específico. Em FTL, foram observadas maiores concentrações de As e Pb no fígado, assim como As e Fe no músculo, enquanto, na FTE, o Ni foi maior no rim e Cd no músculo. Assim, o acúmulo relativo no tecido muscular nas frações solúveis pode refletir uma sobrecarga renal e hepática. O músculo também é capaz de produzir MT e GSH, embora em menor quantidade que o fígado e o rim, de modo que esse tecido também exhibe a capacidade de biotransformar e excretar certos xenobióticos. No entanto, sua capacidade de excreção é limitada e, assim, a maioria dos contaminantes presentes no tecido muscular tende a permanecer no interior das células (Souza *et al.*, 2018).

4.3. Análise de Componentes Principais entre as variáveis MT, GSH e metais em *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

As correlações estatísticas descritas abaixo foram obtidas através de uma Análise de Componentes Principais (do inglês, Principal Component Analysis, PCA), uma técnica de análise multivariada que não depende da presunção de uma distribuição populacional para a exploração descritiva de dados estatísticos. Esse método consiste na redução das dimensões da base de dados, preservando o máximo possível da variabilidade dos dados, de modo a permitir a interpretação dos mesmo de maneira clara, simples e objetiva (Jolliffe e Cadima, 2016).

Análises das funções discriminantes foram realizadas para cada uma das frações subcelulares de *P. blainvillei* e *S. bredanensis* (PPT, FTL e FTE) usando as concentrações obtidas para fígado, rim e músculo de MT, GSH e metais para cada uma das espécies estudadas.

4.3.1. *Pontoporia blainvillei*

4.3.1.1. Fração Insolúvel (PPT)

A análise da função de discriminação realizada para *P. blainvillei* em PPT utilizando as concentrações de elementos encontradas em fígado, rim e músculo são mostradas na Tabela 8. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 8. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de elementos em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei* em PPT

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	8,65	3,02	1,94
Variância total	54,08	18,87	12,15
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
Al	-0,33	-0,69	0,40
V	-0,30	-0,83	-0,26
Cr	-0,55	-0,73	-0,33
Mn	-0,89	0,15	0,26
Fe	-0,77	0,38	-0,10
Ni	-0,57	-0,76	-0,22
Cu	-0,91	-0,06	0,28
Zn	-0,81	0,45	0,07
As	-0,64	-0,19	-0,57
Se	-0,93	0,27	-0,12
Ag	-0,92	-0,01	0,30
Cd	-0,89	0,17	0,09
Hg	-0,93	0,02	0,25
Pb	-0,35	0,28	-0,64
Ti	-0,43	0,41	-0,66
Sn	-0,93	0,03	0,21

Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg e Sn (-0,89, -0,76, -0,90, -0,81, -0,64, -0,93, -0,92, -0,89, -0,93 e -0,93, respectivamente) apresentaram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminante da Função 1. O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos, sendo que Al, V, Cr e Ni apresentaram os maiores coeficientes (-0,69, -0,83, -0,73 e -0,76), respectivamente). Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 28, sendo observada uma boa separação entre os tecidos analisados.

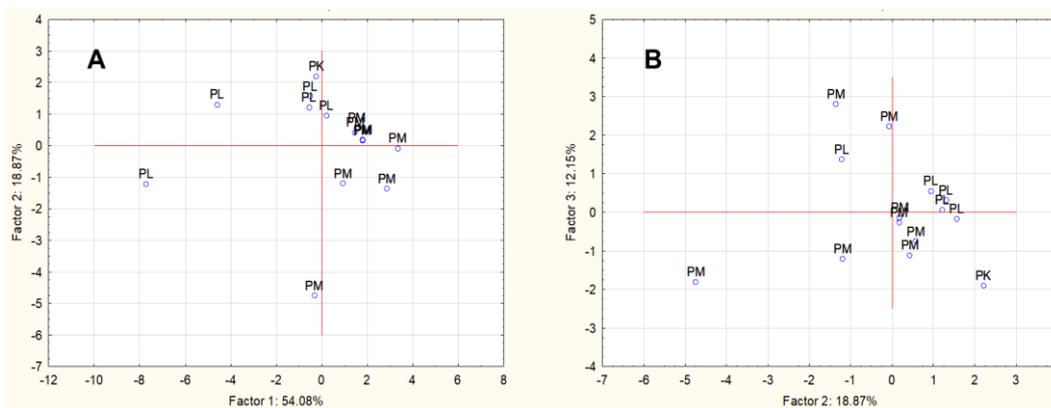


Figura 15, Gráficos de dispersão para descrição de PPT em fígado (PL), rim (PK) e músculo (PM) de *Pontoporia blainvillei*. (A) Função de discriminação 1 versus Função de discriminação 2, (B) Função de discriminação 2 versus Função de discriminação 3.

Foram encontradas associações significativas entre elementos não-essenciais e essenciais em PPT pelo PCA. A associação entre metais não-essenciais, tais como As, Ag, Cd, Hg e Sn, e os metais essenciais Mn, Fe, Cu e Zn, pode indicar possíveis efeitos protetores destes últimos contra os metais não-essenciais. Estudos conduzidos por Land e colaboradores (2018), em sua maioria, utilizando ratos, relatam o efeito protetor exercido por Fe e Zn contra a toxicidade de Hg. Outros estudos, como os conduzidos por Rogalska, Pilat-Marcikiewicz and Brozka (2011), Ganger e colaboradores (2015) e Mesquita e colaboradores (2016), em fígado de ratos, também sugerem um efeito protetor de Zn contra a toxicidade de Cd, As e Hg respectivamente. No entanto, devido à escassez de dados com relação às outras interações encontradas nos indivíduos, não é possível exemplificar outras interações.

Vale ressaltar que o Sn é um contaminante que em sua forma inorgânica apresenta baixa toxicidade, enquanto suas formas orgânicas podem ser muito tóxicas (Blunden e Wallace, 2003). São necessários ainda estudos a respeito deste tema em mamíferos marinhos, visto que existe uma lacuna significativa na literatura para efeitos desse elemento nesses animais. A Função 2 indica associações entre Al, V, Cr e Ni, embora em menor grau. A literatura indica que associações entre elementos não-essenciais são indicativos de mesma origem, seja ambiental ou antropogênica (Jerez *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2009), sendo provável ser este o caso deste estudo.

4.3.1.2. Fração Termolábil (FTL)

Não foi possível observar fatores de significância estatística para *P. blainvillei* em FTL. Isto parece, portanto, indicar que associações entre GSH, MT e os metais analisados não estão associados bioquimicamente, e nenhuma informação a respeito de contaminação e destoxificação pelas vias analisadas podem ser inferidas.

4.3.1.3. Fração Termoestável (FTE)

A análise da função de discriminação em FTE de *P. blainvillei* foi realizada usando as concentrações de MT, GSH e elementos encontradas em fígado, rim e músculo, cujos dados são mostrados na Tabela 9. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 9. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei* em FTE.

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	5,53	2,77	2,17
Variância total	39,52	19,82	15,53
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
MT	0,37	-0,70	0,41
GSH	-0,56	-0,44	0,25
Cr	-0,54	-0,02	-0,62
Mn	-0,94	-0,06	0,21
Fe	-0,86	0,20	-0,32
Ni	0,46	0,74	-0,36
Cu	-0,43	0,41	0,50
Zn	-0,46	0,43	-0,55
As	-0,91	0,02	0,21
Se	-0,01	0,74	0,27
Cd	0,83	0,20	0,14
Hg	-0,05	0,71	0,60
Pb	-0,80	0,10	0,44
Ti	-0,65	-0,21	-0,23

Os elementos Mn, Fe, As, Cd, Pb e Ti (-0,94, -0,86, -0,91, 0,83, -0,79 e -0,65, respectivamente) apresentaram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminante da Função 1. O poder da Função 2 permitiu uma maior discriminação entre os tecidos, onde MT, Ni, Se e Hg apresentaram os maiores coeficientes (-0,70, 0,74, 0,74, e 0,71, respectivamente). Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 16. Pode ser observada uma boa separação entre os tecidos analisados.

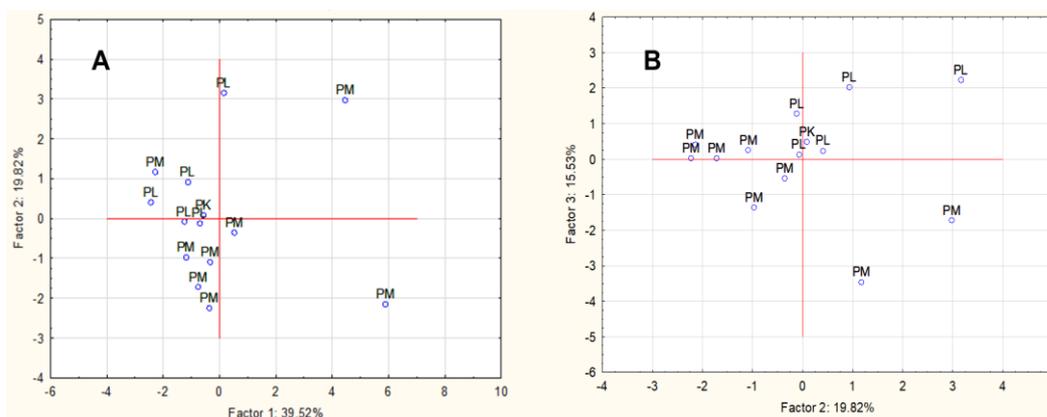


Figura 16. Gráficos de dispersão para descrição de fígado, rim e músculo em FTE em fígado (PL), rim (PK) e músculo (PM) de *Pontoporia blainvillei*. (A) Função de discriminação 1 versus Função de discriminação 2, (B) Função de discriminação 2 versus Função de discriminação 3.

Estes resultados indicam a associação entre elementos não-essenciais, como As, Cd, Pb e Ti, com os elementos essenciais Mn e Fe, podendo indicar possíveis efeitos protetores dos elementos essenciais contra os não-essenciais. No entanto, os dados acerca das interações desses metais nos indivíduos analisados são escassos e pouco disponíveis na literatura. É importante ressaltar que o Ti é um contaminante de preocupação emergente e, geralmente, apresenta baixa toxicidade. Contudo, quando na forma de nanopartículas, este elemento pode causar graves efeitos deletérios em organismos aquáticos (Asztemborska *et al.*, 2018). A lacuna verificada na literatura acerca deste tema reforça a necessidade de novos estudos em mamíferos marinhos. Além disso, as variáveis de Função 2 indicam a associação entre MT e Ni, e entre Se e Hg em FTE e mostram a capacidade de discriminar MT com precisão entre fígado e músculo, devido à contaminação diferencial de metal tornando-a, portanto, um biomarcador útil em estudos de biomonitoramento. A associação entre essas variáveis é considerada interessante, uma vez que já é conhecida a capacidade da MT de se ligar a todos os metais presentes na Função 2 (As, Cd, Pb e Ti) (Waalkes *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2017), muito embora estudos realizados sobre Ti e metaloproteínas mostrem que este só tende a induzir e se ligar a elas quando na forma de nanopartículas, (Sureda *et al.*, 2018). Assim, a FTE é uma escolha interessante para a avaliação da via de desintoxicação mediada por MT em *P. blainvillei*, sendo capaz de elucidar mecanismos bioquímicos e a ligação específica entre certos metais e MT.

4.3.2. *Steno bredanensis*

4.3.2.1. Fração Insolúvel (PPT)

A análise da função de discriminação em PPT de *S. bredanensis* realizada usando as concentrações de elementos em fígado, rim e músculo é mostrada na Tabela 10. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 10. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis* em PPT

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	6,59	2,84	1,89
Variância total	41,19	17,79	11,84
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
Al	-0,39	0,33	-0,20
V	-0,47	0,05	-0,40
Cr	-0,33	0,91	0,11
Mn	-0,86	-0,04	-0,23
Fe	-0,83	-0,08	0,22
Ni	-0,28	0,94	0,09
Cu	-0,91	0,15	-0,02
Zn	-0,75	-0,23	0,56
As	-0,59	-0,04	-0,49
Se	-0,59	-0,28	0,71
Ag	-0,80	-0,07	-0,19
Cd	-0,18	-0,08	-0,34
Hg	-0,88	-0,18	0,33
Pb	0,11	0,87	0,20
Ti	-0,65	-0,18	-0,42

Os elementos Cu, Hg, Mn, Fe, Ag, Zn e Ti (-0,91, -0,88, -0,85, -0,83, -0,80, -0,75 e -0,65, respectivamente) exibiram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminatório da Função 1. O poder da Função 2 permitiu

maior discriminação entre os tecidos, em que Ni, Cr e Pb apresentaram os maiores coeficientes (0,93, 0,91 e 0,87), respectivamente. Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 17. O músculo e o fígado foram consistentemente separados para cada espécie. Os rins foram agrupados principalmente com músculo, possivelmente devido ao baixo número de amostras para este tecido.

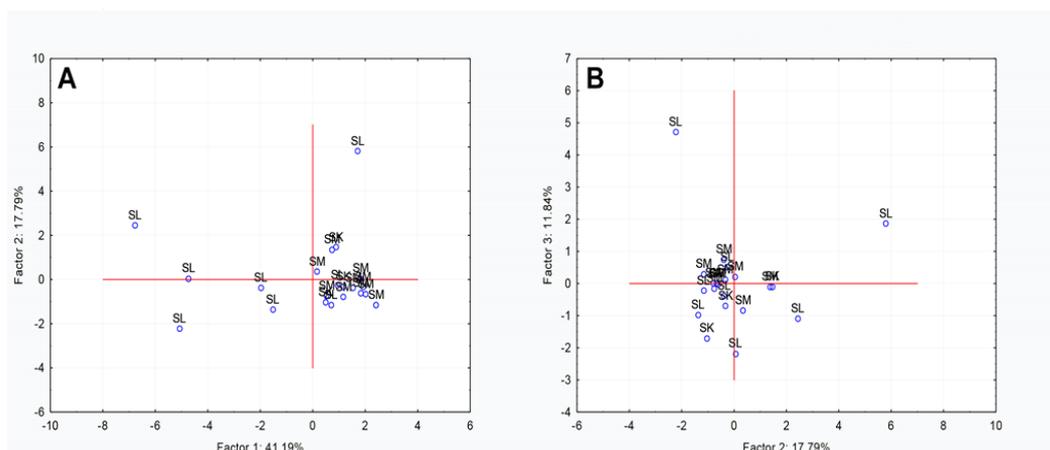


Figura 17. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular, renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de *Steno bredanensis*. Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.

Associações significativas entre elementos não-essenciais e essenciais foram detectadas em PPT pelo PCA. A associação de metais não-essenciais, Hg, Ag e Ti, com Cu, Mn, Fe e Zn, pode indicar papéis protetores contra esses metais não-essenciais. Alguns estudos relataram um efeito protetor de Fe e Zn contra a toxicidade de Hg, com a maioria dos estudos sendo realizada em ratos (Land *et al.*, 2018). No entanto, dados escassos sobre outras interações citadas em organismos superiores estão disponíveis. Novos estudos a esse respeito são necessários em mamíferos marinhos, uma vez que existe uma lacuna significativa na literatura para esse elemento nesses animais.

A Função 2 também indica associações com Ni, Cr e Pb, embora em menor grau. Associações entre Zn e Pb e Cu e Pb foram detectadas na FTE (discutido adiante), e a presença de associações semelhantes na fração PPT pode indicar os efeitos protetores já existentes antes da desintoxicação da MT.

4.3.2.2. Fração Termolábil (FTL)

A análise da função de discriminação em FTL de *S. bredanensis* realizada usando as concentrações de elementos em fígado, rim e músculo é mostrada na Tabela 11. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 11. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis* em FTL

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	4,58	3,48	1,80
Variância total	32,76	24,89	12,83
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizado		
Al	-0,51	-0,16	-0,32
Cr	0,43	0,35	-0,18
Mn	0,90	0,34	-0,10
Fe	0,44	-0,38	-0,66
Ni	-0,00	0,00	0,18
Cu	0,61	-0,75	0,11
Zn	0,39	-0,44	-0,67
As	0,85	0,42	0,02
Se	0,43	-0,70	0,48
Cd	-0,43	-0,52	-0,56
Hg	0,50	-0,73	0,34
Pb	0,87	0,38	-0,16
Ti	0,53	0,54	-0,00
Sn	0,45	-0,62	0,09

Os elementos Mn, Pb, As, Cu com 0,90, 0,87, 0,85 e 0,61, respectivamente, apresentaram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminatório da Função 1. O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos, onde Cu, Se, Hg e Sn apresentaram os maiores coeficientes, 0-0,75, -0,70, -0,73 e -0,61, respectivamente. Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 18. O músculo e o fígado foram consistentemente separados para cada espécie. Os rins foram agrupados principalmente com músculo, possivelmente devido ao baixo número de amostras para este tecido.

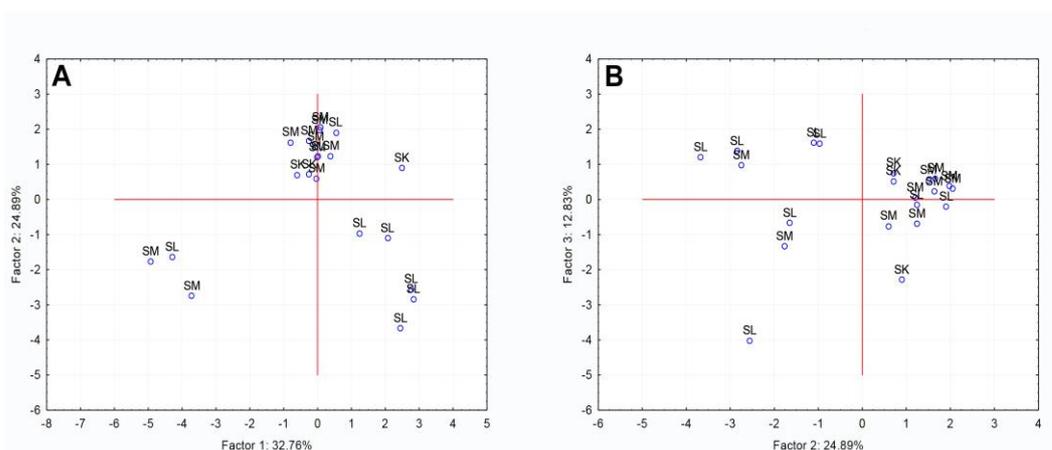


Figura 18. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular, renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de *Steno bredanensis*. Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.

Associações significativas entre elementos não-essenciais e essenciais foram detectadas no FTL pelo PCA. Cu e Mn, portanto, podem apresentar efeitos protetores contra Pb e As. Isto é, ainda, corroborado pelas correlações de Spearman estatisticamente significativas observadas na FTL entre Cu no fígado e Pb no músculo, indicativo de possíveis tentativas de destoxificação, que serão discutidas adiante. A presença de uma associação entre Se e Hg também é interessante, uma vez que Se é conhecido por exibir um efeito protetor contra Hg (Lailson-Brito *et al.*, 2012). É evidente que as correlações interelementares contêm importantes informações de destoxificação no que diz respeito aos efeitos protetores dos metais essenciais contra elementos não-essenciais e, portanto, o FTL, embora contenha elementos termolábeis que podem não ser totalmente biodisponíveis, é útil para melhor entender os mecanismos de destoxificação em *S. bredansis*. A ação de enzimas de destoxificação e proteínas não enzimáticas na destoxificação de metais não pode ser descartada nesta fração, já que se sabe que o GSH, por exemplo, pode se ligar a vários metais, como Hg, Pb e As (Rubino,

2015) e algumas enzimas, como a glutationa-s-transferase, que foi relatada como sendo diretamente envolvida na extinção de íons Cd, formando complexos GSH-cádmio (Adamis *et al.*, 2004).

4.3.2.3. Fração Termoestável (FTE)

A análise discriminante na FTE de *S. bredanensis* realizada utilizando as concentrações de MT, GSH e metais em fígado, rim e músculo é apresentada na Tabela 12. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 12. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis* em FTE.

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	4,36	3,63	19,79
Variância total	29,12	24,22	13,19
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
MT	0,76	-0,35	0,21
GSH	0,60	-0,31	0,57
Al	-0,23	0,24	-0,27
Cr	-0,32	-0,65	-0,02
Mn	-0,88	-0,06	0,42
Fe	0,10	-0,38	0,42
Ni	-0,27	0,09	-0,06
Cu	-0,23	-0,87	-0,05
Zn	-0,15	-0,65	0,17
As	-0,94	0,03	0,16
Se	-0,15	-0,87	-0,36
Cd	0,34	-0,22	0,77
Hg	-0,24	-0,82	-0,38
Pb	-0,90	0,04	0,35
Ti	-0,66	0,26	0,31

Como Pb, Mn, MT e Ti (-0,94, -0,90, -0,88, 0,75 e -0,66, respectivamente) apresentaram os maiores coeficientes, estes contribuiriam mais para o poder discriminatório da Função 1. O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos, em que Cu, Se, Hg, Zn e Cr apresentaram os maiores

coeficientes (-0,87, -0,87, -0,82, -0,65 e -0,65, respectivamente). Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 19. O músculo e o fígado foram consistentemente separados para cada espécie. Os rins foram agrupados principalmente com músculo, possivelmente devido ao baixo número de amostras para este tecido.

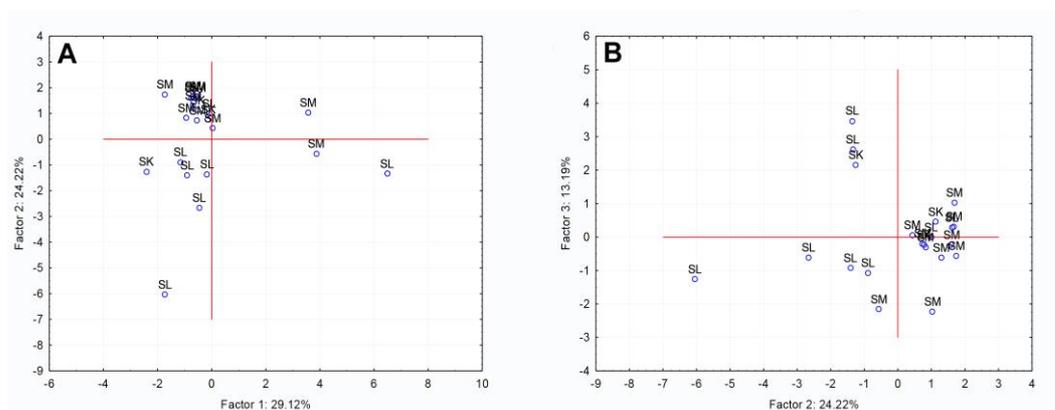


Figura 19. Gráfico de Dispersão para discriminação de tecido muscular, renal e hepático em fígado (SL), rim (SK) e músculo (SM) de *Steno bredanensis*. Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3.

Estes resultados indicam que a MT associada a As, Pb, Mn e Ti na fração de FTE é capaz de discriminar com precisão entre fígado e músculo devido à contaminação diferencial de metal e é, portanto, um biomarcador útil em estudos de biomonitoramento. A associação entre essas variáveis é interessante, pois se sabe que a MT se liga a todos os metais presentes na Função 1 (As, Pb, Mn e Ti) (Waalkes *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2017), embora Ti pareça induzir e se ligar a essas metaloproteínas somente quando na forma de nanopartículas (Sureda *et al.*, 2018). Além disso, as variáveis de Função 2, Cu e Zn, por apresentarem características físico-químicas semelhantes e serem os principais elementos a se ligar à MT, a fim de manter a homeostase da função celular diversificada, espera-se que exibam uma associação. A presença de uma associação entre Se e Hg é interessante, já que Se é conhecido por exibir um efeito protetor contra Hg, como discutido anteriormente. Assim, a FTE é uma escolha interessante em relação à avaliação da via de detoxificação mediada por MT em *S. bredanensis* e pode elucidar mecanismos bioquímicos e a ligação específica de certos metais à MT.

4.4. Correlações de Spearman

As correlações foram calculadas pelo modelo de Spearman e, foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foram observadas correlações entre metais não-essenciais e essenciais, assim como entre dois metais não-essenciais e dois metais essenciais. Não foram observadas correlações significativas no rim de *P. blainvillei*, devido ao baixo número de amostras. Não foram observadas correlações significativas ($p < 0,05$) entre os metais analisados e MT e GSH.

Foram observadas diversas correlações fracas, moderadas, fortes e muito fortes, porém serão discutidas apenas as fortes e muito fortes. A Tabela 13 mostra as correlações significativas fortes e muito fortes que foram encontradas entre metais essenciais para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*.

Tabela 13 . Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais essenciais encontrados em *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

<i>P. blainvillei</i>		<i>S. bredanensis</i>	
Par elementar	Força da correlação	Par elementar	Força da correlação
Mn (F) x Fe (F)	$r_s = -0,82$	Cu (F) x Se (F)	$r_s = 0,89$
Mn (M) x Cu (M)	$r_s = 0,77$	-	-
Mn (M) x Zn (M)	$r_s = 0,72$	-	-
Fe (M) x Cu (M)	$r_s = 0,77$	-	-
Cu (M) x Zn (M)	$r_s = 0,87$	-	-

Correlações entre metais essenciais indicam processos homeostáticos no organismo, participando de reações enzimáticas através de metaloenzimas, dentre outros processos. Por exemplo, é de se esperar que correlações significativas existam entre Cu e Zn, devido às funções de transporte e anti-oxidante da enzima Cu/Zn-superóxido dismutase (Zelko, Mariani e Folz, 2002), e entre Mn e outros elementos essenciais devido à atuação da Mn- superóxido dismutase (Sarsour *et al.*, 2012).

Já a Tabela 14 mostra as correlações significativas fortes e muito fortes que foram encontradas entre metais não-essenciais para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*.

Tabela 14. Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais não-essenciais encontrados em *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

<i>P. blainvillei</i>		<i>S. bredanensis</i>	
Par elementar	Força da correlação	Par elementar	Força da correlação
Cr (F) x Ni (F)	$r_s = 0,93$	Al (F) x As (M)	$r_s = -0,81$
Cr (F) x As (F)	$r_s = 0,82$	Pb (F) x Sn (F)	$r_s = -0,95$
Cr (F) x Hg (F)	$r_s = 0,86$	Al (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Cr (F) x Pb (F)	$r_s = 0,89$	As (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Ni (F) x As (F)	$r_s = 0,89$	Cd (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Ni (F) x Hg (F)	$r_s = 0,96$	Hg (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Ni (F) x Pb (F)	$r_s = 0,82$	Pb (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Hg (F) x Pb (F)	$r_s = 0,86$	Ti (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Cr (M) x Pb (M)	$r_s = 0,82$	-	-
Ni (M) x Pb (M)	$r_s = 0,76$	-	-

Metais não-essenciais são, comumente, oriundos da ação antropogênica e, correlações entre eles indicam que, possivelmente, estes elementos são advindos da mesma fonte de contaminação, como dito anteriormente (Jerez *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2009)

A Tabela 15 mostra as correlações significativas fortes e muito fortes que foram encontradas entre metais não-essenciais e essenciais para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*.

Tabela 15. Correlações significativas ($p < 0,05$) entre metais não-essenciais e essenciais encontrados em *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

<i>P. blainvillei</i>		<i>S. bredanensis</i>	
Par elementar	Força da correlação	Par elementar	Força da correlação
Mn (F) x Ni (F)	$r_s = 0,93$	Fe (F) x Cd (M)	$r_s = -0,78$
Mn (F) x As (F)	$r_s = 0,79$	Ni (F) x Fe (M)	$r_s = -0,87$
Fe (F) x Ni (F)	$r_s = -0,75$	Cu (F) x Hg (F)	$r_s = 0,83$
Zn (F) x Ni (F)	$r_s = -0,82$	Se (F) x Hg (F)	$r_s = 0,86$
Se (F) x Cd (F)	$r_s = 0,86$	Mn (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Mn (M) x Cr (M)	$r_s = 0,75$	Cu (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Mn (M) x Pb (M)	$r_s = 0,82$	Zn (R) x Cd (M)	$r_s = -0,87$
Cu (M) x Hg (M)	$r_s = -0,73$	Mn (M) x Ni (M)	$r_s = -0,95$

Correlações entre metais não-essenciais e essenciais, porém, podem significar possíveis efeitos protetores exercidos pelo metal essencial contra os efeitos adversos apresentados pelo metal não-essenciais (Land *et al.*, 2018), que podem ser postulados através do cálculo de razões molares, descritos a seguir.

4.5. Razões molares

Alguns metais essenciais associam-se a elementos não-essenciais no organismo para evitar efeitos deletérios, embora esse mecanismo não seja bem investigado e apenas algumas dessas associações tenham sido descritas na literatura (Land *et al.*, 2018). Para avaliar melhor as associações significativas entre metais e metalóides e inferir possíveis efeitos deletérios, as razões molares entre elementos essenciais e não-essenciais em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei* e *S. bredanensis* que apresentaram correlações significativas de Spearman foram calculadas para a FTE e apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Razões molares e possíveis efeitos protetores em *P. blainvillei* e *S. bredanensis* fígado, rim e músculo.

Espécie	Matriz	Elementos	Razão molar	Efeito protetor postulado
<i>P. blainvillei</i>	Fígado	Mn (F) x Ni (F)	30:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Ni
		Mn (F) x As (F)	2:1	Proteção contra efeitos tóxicos de As
		Fe (F) x Ni (F)	417:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Ni
	Músculo	Zn (F) x Ni (F)	56:1	
		Se (F) x Cd (F)	8:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Cd
		Mn (M) x Cr (M)	1:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Cr
		Mn (M) x Pb (M)	7:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Pb
		Cu (M) x Hg (M)	6:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Hg
<i>S. bredanensis</i>	Fígado e Músculo	Fe (F) x Cd (M)	112:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Cd
		Fe (M) x Ni (F)	3:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Ni
	Fígado	Cu (F) x Hg (F)	1:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Hg
		Se (F) x Hg (F)	1,3:1	
	Rim e músculo	Mn (R) x Cd (M)	19:1	
		Cu (R) x Cd (M)	9:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Cd
	Músculo	Zn (R) x Cd (M)	63:1	
Mn (M) x Ni (M)		31:1	Proteção contra efeitos tóxicos de Ni	

4.5.1. Efeito protetor contra As

O As é um elemento não-essenciais e carcinogênico, conhecido por causar mau funcionamento de mecanismos celulares importantes, como mitose e respiração celular, sendo também capaz de contribuir para o estresse oxidativo. As formas inorgânicas de As são muito mais tóxicas do que as orgânicas e, em ambientes aquáticos, estas últimas são mais frequentemente observadas (Land *et al.*, 2018).

Em *P. blainvillei* foi encontrada uma correlação entre Mn e As, com razão molar de 2:1. Harder e colaboradores (2007) estudaram possíveis efeitos protetores de Se, Mn, metionina, entre outros contra a toxicidade de As em pássaros. De acordo com esse estudo, o Mn aparenta exercer proteção contra os efeitos de As. Porém, não foram encontrados na literatura estudos que comprovem esta relação em mamíferos, sendo assim necessários mais estudos sobre essas relações.

4.5.2. Efeito protetor contra Cd

A alta toxicidade do Cd se deve, entre outros fatores, ao estresse oxidativo sofrido pelas células devido à exposição a este elemento e, as interações entre o Cd e os metais essenciais, como Fe, Ca e Zn, que podem reduzir sua toxicidade (Land, *et al.*, 2018). A presença de Cd no interior da célula pode levar à destruição de membranas celulares, devido à sua capacidade de estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem então induzir a peroxidação lipídica e outros efeitos bioquímicos prejudiciais (Rogalska, Pilat-Marcikiewicz e Brozka., 2011).

No presente estudo, para *S. bredanensis*, foram observados possíveis efeitos protetores de Cu, Mn e Zn encontrados no rim contra o Cd do músculo, com razões molares de 9:1, 19:1 e 63:1 respectivamente, além de uma correlação entre Fe, encontrado no fígado, e Cd, no músculo, com uma razão molar de 112:1. Para *P. blainvillei* foi observado um possível efeito protetor de Se contra Cd, com razão molar de 8:1 em fígado.

Em um estudo realizado por Jihen *et al.* (2008), ratos foram divididos em 5 grupos, nos quais foram administradas diferentes doses: 200 ppm de Cd; 200 ppm Cd e 500 ppm de Zn; 200 ppm de Cd e 0,1 ppm de Se; e 200 ppm de Cd, 500 ppm de Zn e 0,1 ppm de Se, em um período de 24 horas. Foi sugerido um possível efeito protetor do Se e Zn em relação ao Cd. O estudo realizado por

Rogalska, Pilat-Marcikiewicz e Brozka. (2011), que expôs ratos a Zn (30 e 60 mg L⁻¹) e/ou Cd (5 e 50 mg L⁻¹) ao longo de 6 meses, confirma uma proteção parcial de Zn contra danos no tecido hepático de ratos, assim como o estudo realizado por Jamakala e Rani (2014), no qual Cd (22,5 mg kg⁻¹), Zn (12 mg kg⁻¹) e Fe (40 mg kg⁻¹) foram administrados oralmente em ratos ao longo de períodos variando entre 7, 15 e 30 dias, que mostra os efeitos protetores de Zn e Fe no fígado desses animais. Já Eybl e Kotyzová (2010), ao estudar a toxicidade de Cd em ratos, expuseram estes animais a doses de 7 mg kg⁻¹ de Cd e 20 mg kg⁻¹ de Mn ao longo de 24 horas e observaram um possível efeito protetor de Mn contra Cd. Liu e colaboradores (1992) mostraram, por meio de um estudo computacional, os possíveis efeitos protetores de Cu e Zn contra a toxicidade de Cd em rins de ratos, utilizando como variáveis para os cálculos as concentrações de Zn (0 e 25 mg kg⁻¹), Cu (0 e 12,5 mg kg⁻¹) e Cd (0,1 e 0,4 mg kg⁻¹).

O acúmulo de Cd no fígado e rim é devido à sua alta biodisponibilidade e é de grande preocupação, pois, mesmo em baixas concentrações, esse elemento pode levar a alterações patológicas no tecido hepático (Jihen *et al.*, 2008). Como este elemento foi significativamente detectado em FTE, que contém MT, e Zn é capaz de induzir a síntese de MT (Rafique, Shaikh e Tahir, 2010), a toxicidade de Cd pode ser diminuída pela redistribuição de Cd pelo corpo pela superexpressão de Zn, o que explicaria a extremamente alta razão molar Zn:Cd observada aqui. Além disso, o Zn é conhecido por seu papel na prevenção do estresse oxidativo e, portanto, também pode ajudar na proteção contra a destruição de membranas celulares causada por Cd (Jihen *et al.*, 2008). Portanto, o Zn pode proteger o fígado contra danos funcionais e estruturais, embora isso dependa da quantidade de Zn biodisponível. No entanto, o Zn foi detectado, principalmente, na fração insolúvel. Assim, parece que quantidades ainda menores de Zn na FTE, em comparação com PPT, podem ser capazes de se ligar eficientemente ao Cd. Essa interação complexa entre Zn e Cd ainda é pouco investigada, especialmente em mamíferos marinhos, e merece estudos adicionais.

4.5.3. Efeito protetor contra Hg

O Hg é considerado um metal extremamente tóxico, sendo capaz de bioacumular ao longo da cadeia trófica, e, quando em sua forma orgânica, como por exemplo metilmercúrio, é capaz de penetrar em biomembranas e acumular no tecido adiposo e fígado. Dentre seus possíveis efeitos colaterais, os mais

conhecidos são os possíveis danos causados aos rins e sistema nervoso (Land *et al.*, 2018).

O Se desempenha um papel importante no mecanismo de defesa celular e, portanto, é considerado um importante antioxidante natural (Elgaml *et al.* 2015). O Cu tem muitas funções metabólicas diferentes, como a síntese de metaloproteínas, incluindo a MT, e propriedades antioxidantes (Land *et al.*, 2018; Flora *et al.*, 1982). Neste estudo, foram observadas correlações entre Cu-Hg e Se-Hg no fígado de *S. bredanensis* e, as razões molares para estas associações foram de 1:1 e 1,3:1 respectivamente. Em *P. blainvillei*, foi observada uma associação entre Cu-Hg em músculo, com razão molar de 6:1.

Estudos realizados em ratos expostos a compostos de Hg e Se mostraram que o segundo exerce um efeito protetor contra o primeiro, protegendo os indivíduos analisados, ao menos parcialmente, da toxicidade de Hg (Li *et al.*, 2014). Embora baixas concentrações de Cu e Se tenham sido encontradas na FTE, parece que mesmo pequenas quantidades desses analitos são capazes de se ligar eficientemente ao Hg e promover um efeito protetor contra sua toxicidade no organismo.

Quanto a possíveis efeitos protetores de Cu contra Hg, estudos conduzidos por Roesijadi e Fellingham (1987), mostram que, quando expostos a concentrações variadas de Cu e a uma concentração fixa de 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, mexilhões tendem a ter sua tolerância à toxicidade de Hg aumentada. Já os estudos realizados por Singh e Singh (1992) demonstram que concentrações equimolares de Cu^{2+} com Hg^{2+} (1,5 μm) ou CH_3Hg^+ (0,6 μm) são capazes de antagonizar a toxicidade desses compostos.

4.5.4. Efeito protetor contra Pb

O Pb é um metal não-essenciais que pode ser absorvido e distribuído pelo corpo, levando a efeitos perigosos em muitos tecidos e órgãos diferentes, incluindo o estresse oxidativo (Elgaml *et al.*, 2015). Neste cenário, alguns metais, como Se, Cu e Zn, mostraram potencial para reduzir os níveis de Pb e, portanto, sua toxicidade (Flora *et al.*, 1982; Markiewicz-Górka *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi observada uma correlação entre Mn e Pb, com razão molar de 7:1. Porém, a literatura não apresenta quase nenhum estudo a respeito desta associação. Em um estudo realizado com ratos expostos a soluções aquosas de Pb (0,2 mg L^{-1}) e Mn (2 mg L^{-1}), Markiewicz-Górka e colaboradores (2015), foi observada uma correlação entre esses analitos, porém

não foi observado nenhum efeito protetor do metal essencial sobre o não-essenciais. Dada a falta de informações adicionais na literatura, não foi possível discutir essa relação e mais estudos sobre o tema devem ser realizados.

4.5.5. Efeito protetor contra Ni

O Ni é um contaminante que pode ocasionar efeitos subletais como problemas de crescimento, disfunção neuromuscular e disfunções reprodutivas. Dentre as possíveis formas de exposição a ele temos a via oral, absorção cutânea ou inalação, sendo que a exposição pode ser aguda ou crônica (Outridge e Scheuhmmer, 1993).

Neste estudo foi observada uma correlação entre Zn e Ni, com razão molar de 56:1. De acordo com os estudos conduzidos por Joshi e colaboradores (2004), quando ratos são expostos à Zn (10 mg kg^{-1}) por um período de 24 horas e posteriormente a NiCl_2 ($150 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$) pelo mesmo período, o Zn possivelmente apresenta um efeito protetor contra a toxicidade de Ni em fígado e rim destes animais. Porém, não foram encontrados na literatura estudos sobre possíveis efeitos protetores de Mn e Fe contra a toxicidade de Ni, indicando que é necessário ampliar os estudos nessa área devido à lacuna de conhecimento observada.

4.6. Detecção de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS

A metalômica é a área que tem como objeto de estudo as diferentes variantes metálicas presentes no organismo, assim como sua quantidade, identidade e localização, o que inclui, portanto, o estudo das metaloproteínas, que são proteínas ligadas a metais. Este tipo de estudo também tem como foco a caracterização estrutural e funcional, identificação e quantificação das metaloproteínas em organismos vivos (Lavradas *et al.* 2016).

Para caracterizar a fração FTE dos golfinhos analisados, contendo proteínas termoestáveis, foi utilizada a técnica de separação de proteínas por meio de cromatografia por exclusão de tamanho (do inglês, *size exclusion chromatography*, SEC) acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High performance liquid chromatography*, HPLC) que, acoplada com a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, permite detectar diversas proteínas ligadas a metais simultaneamente (González-Ferández *et al.*, 2008).

De acordo com a calibração da coluna mostrada anteriormente na Figura 6, pode-se comparar os tamanhos ds metaloproteínas caracterizadas nas amostras. Feito isso verificamos que os perfis cromatográficos apresentam os seguintes tempos de retenção: BSA (11 minutos e 67 kDa), MT (17 minutos e 7 kDa) e GSH (21 minutos e 0,3 kDa). Esses tempos estão marcados nas figuras abaixo por retas verdes.

4.6.1. Metaloproteínas em *Pontoporia blainvillei*

Os perfis cromatográficos para as frações termoestáveis de fígado, rim e músculo de *P. blainvillei* apresentaram algumas variações, entretanto, todos os elementos analisados eluíram entre 10 e 30 minutos. Todas as amostras apresentaram picos evidentes para Cu, Ni e Ti, assim como para Cr e Zn, que estiveram presentes na maioria das amostras. Os elementos Hg e Pb, não registraram presença em todos os indivíduos analisados e os picos referentes a estes analitos são pequenos, sendo que para o indivíduo P8 M não houve ligação entre Hg e proteína. As e Se exibiram picos consideravelmente pequenos e, apenas para o indivíduo P7 M, o mesmo ocorreu para Cd (P4 M), Co (P12 F) e Sn (P6 F). Uma vez que foi injetada sempre a mesma quantidade de proteína (40 µg) para todas as amostras, algumas comparações relativas à intensidade dos picos foram realizadas. As Figuras 20 a 22 mostram o perfil exibido por esses analitos nas amostras de fígado, rim e músculo de *P. blainvillei*.

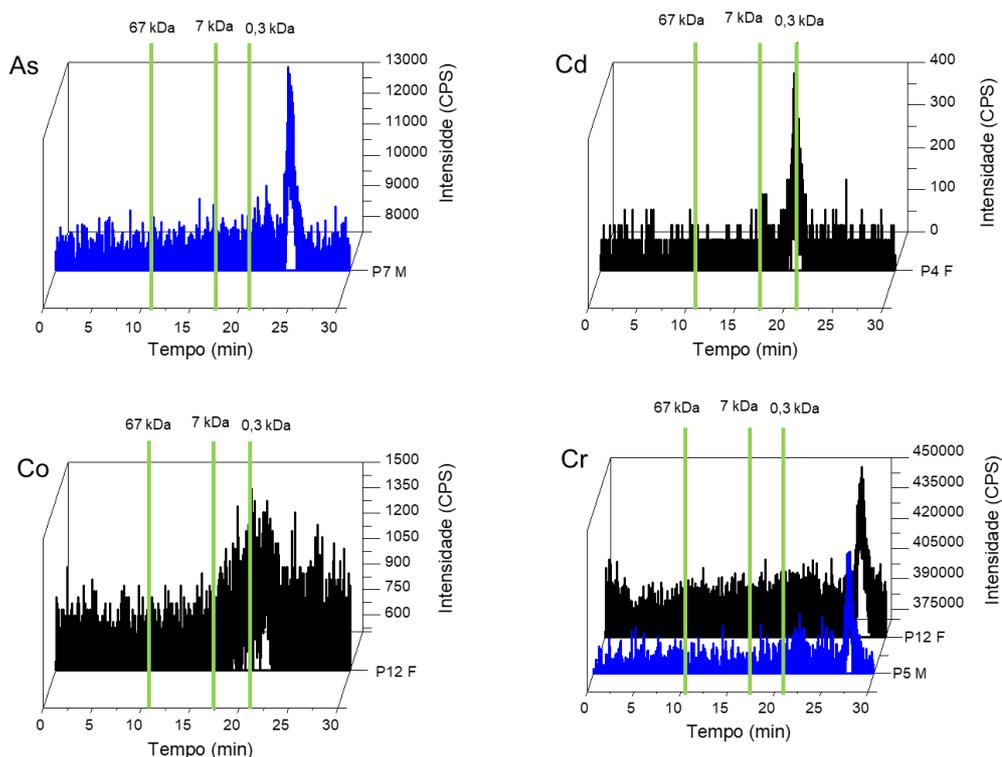


Figura 20. Proteínas ligadas a As, Cd, Co e Cr observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado e músculo de *P. blainvillei*. (F) – (preto) - Fígado, (R)- (azul) - Rim. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Apenas uma amostra apresentou pico para Cd, tendo sido observado aproximadamente aos 21 minutos, indicando uma possível ligação entre este elemento e a GSH que, no cromatograma para os padrões (Figura 6), apresentou tempo de retenção muito similar. Essa complexação foi descrita por Jacquart *et al.* (2017) como entalpicamente favorável em pH 7,4, fisiológico. Assim, podemos inferir que ao menos uma parte do Cd presente no indivíduo P4 M foi detoxificado por essa interação. Assim como para o Cd, apenas uma amostra apresentou pico para Co, com tempo de retenção de aproximadamente 21 minutos. Conseqüentemente, é possível que tenha ocorrido a complexação entre a GSH e o Co neste indivíduo (Singh *et al.*, 2001).

Os tempos de retenção observados para As e Cr (25 e 27 minutos respectivamente) indicam que estes elementos estão ligados a metaloproteínas de peso molecular inferior ao da GSH (0,3 kDa), para as quais não foram utilizados padrões de calibração, bem como não foram encontrados dados na literatura, corroborando a necessidade de estudos futuros a respeito do tema.

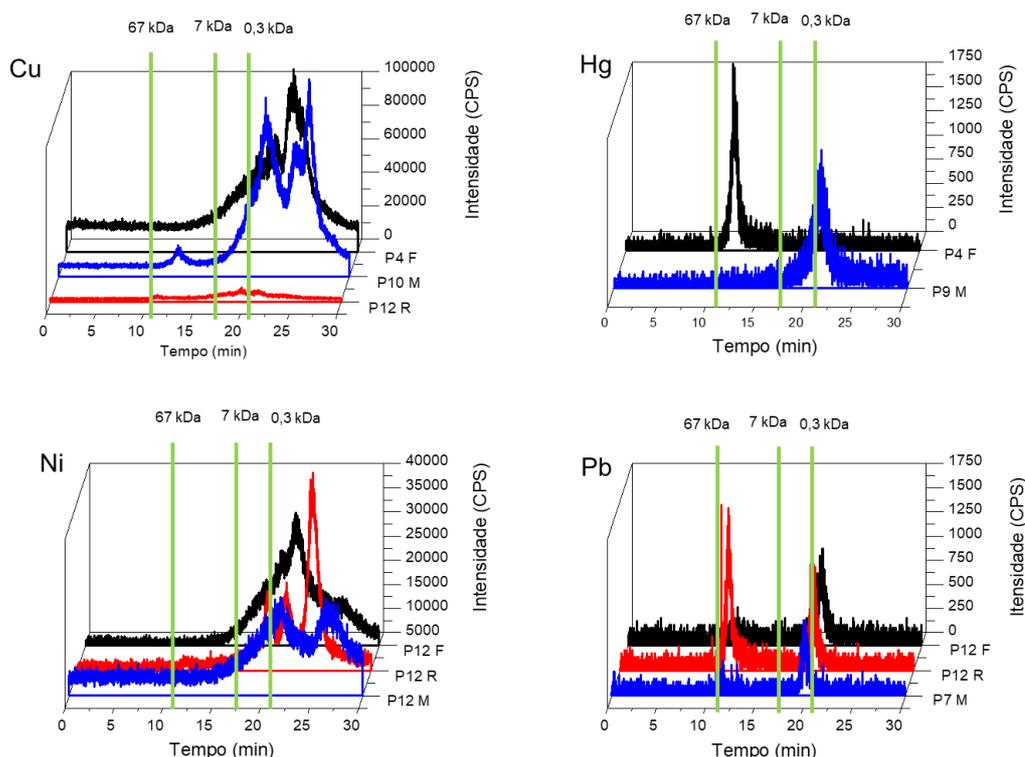


Figura 21. Proteínas ligadas à Cu, Hg, Ni e Pb observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei*. (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Todos os indivíduos analisados apresentaram pico para Cu, com tempo de retenção em aproximadamente 21 minutos, indicando a possível complexação entre a GSH e este metal, indicando a ocorrência de destoxificação, ainda que parcial, por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001). Em músculo também foi observado um tempo de retenção em aproximadamente 13 minutos, indicando que, além da complexação com GSH, uma parte do Cu pode ter sido complexado por uma proteína de peso molecular próximo a 67 kDa (Inesi, 2017).

Os perfis observados para Hg diferem entre os tecidos analisados, sendo que apenas três amostras de fígado e cinco amostras de músculo apresentaram picos. Em fígado foram observados tempos de retenção de aproximadamente 11 minutos indicando uma possível destoxificação neste tecido pela complexação de Hg com a metaloproteína em questão, tendo esta peso molecular próximo a 67 kDa, dado que o tempo de retenção de Hg se assemelha ao do padrão de BSA (Li *et al.*, 2018). No tecido muscular, por outro lado, os tempos de retenção observados foram de aproximadamente 21 minutos, indicando complexação entre Hg e GSH e destoxificação por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001).

Assim como para Cu, todas as amostras analisadas apresentaram picos para Ni, tendo estes tempos de retenção 21 e 27 minutos. O primeiro pico (20 min)

indica possível complexação com a GSH e consequentemente destoxificação por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001). Os picos observados em 27 minutos podem ser atribuídos a metaloproteínas de peso molecular inferior a 0,3 kDa, mostrando a necessidade de estudos futuros sobre a termoestabilidade de metaloproteínas.

Todas as amostras de fígado e rim, assim como cinco amostras de músculo apresentaram picos em aproximadamente 21 minutos, sendo este o mesmo tempo de retenção da GSH no padrão. De acordo com estudos conduzidos por Jacquart *et al.* (2017), a complexação entre GSH e Pb é entalpicamente favorável, ou seja, o efeito tóxico deste metal possivelmente foi reduzido por essa reação. Na amostra de rim, também foi observado um tempo de retenção de aproximadamente 11 minutos, para o indivíduo P12 R, indicando que uma parte da concentração total de Pb neste indivíduo pode ter sido complexado por uma metaloproteína de peso molecular próximo a BSA (67 kDa) (Conick, 2011).

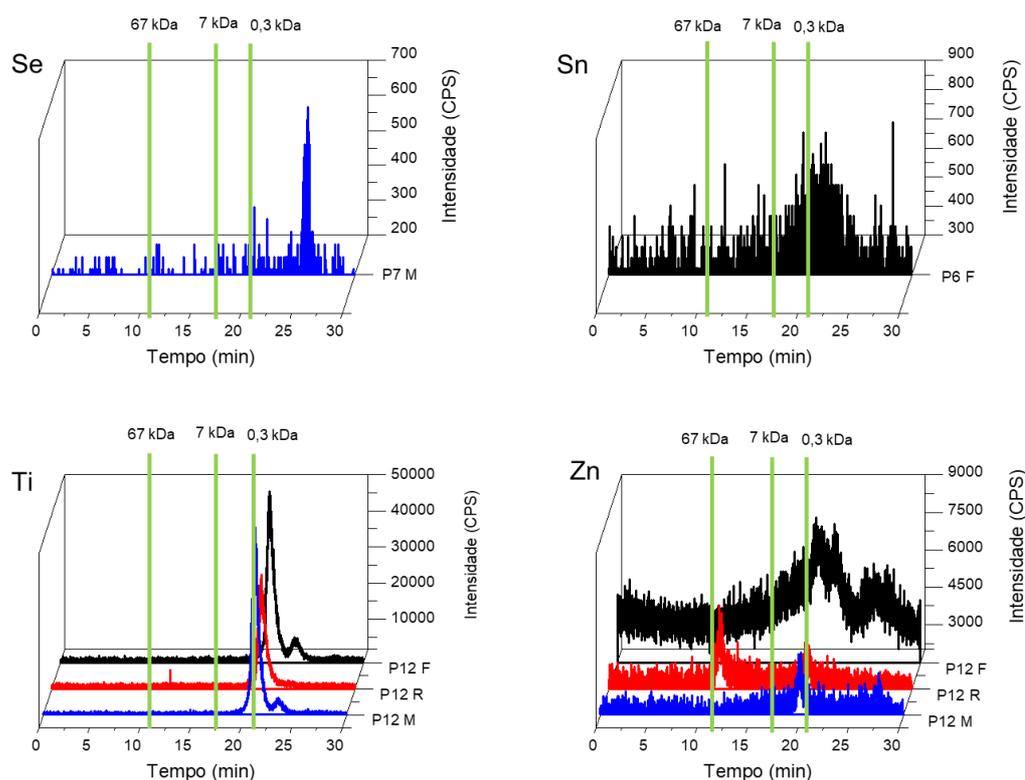


Figura 22. Proteínas ligadas a Se, Sn, Ti e Zn observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de *P. blainvillei*. (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Apenas um pico, muito sutil, de aproximadamente 600 cps, foi observado para Se em uma única amostra de músculo, indicando a baixa concentração desse analito no indivíduo em questão. O tempo de retenção observado foi de aproximadamente 25 minutos o que, de acordo com a literatura, indica que Se aparenta estar na forma de Se–metionina (0,2 kDa) ou Se–uréia (0,1 kDa) (Pizarro *et al.*, 2004). Para Sn foi observado excesso de interferência no cromatograma obtido, assim como um pico consideravelmente pequeno. O metal aparenta estar ligado a GSH, entretanto, não há registros de estudos sobre a formação do complexo Sn-GSH na literatura.

São, portanto, necessários estudos futuros sobre esse tema, para metais e metaloproteínas, de modo a aumentar a resolução da análise, assim como permitir a realização de uma análise mais precisa das proteínas ligadas a esses metais.

Todas as amostras analisadas apresentaram intensidades altas para Ti indicando, assim, contaminação por este analito em todos os indivíduos. O tempo de retenção observado foi de aproximadamente 21 minutos, o que indica uma possível complexação entre Ti e GSH, no entanto, como este é um contaminante emergente, não foram encontrados registros na literatura sobre a formação do complexo Ti-GSH, o que, novamente, evidencia a necessidade de mais estudos para a caracterização das proteínas ligadas a este metal.

Nas amostras de fígado e músculo, Zn apresentou tempos de retenção de aproximadamente 21 minutos, similar ao que foi observado para o padrão de GSH. O estudo conduzido por Zhou e colaboradores (2012) mostra as possíveis formas de complexação entre GSH e Zn e sua estabilidade, além e ressaltar a importância para os sistemas biológicos. Tempos de retenção de 11 min e 21 min foram observados no rim, para o indivíduo P12 R indicando que, além da complexação com a GSH, uma parte do Zn está complexado com uma proteína de tamanho próximo a BSA (67 kDa), podendo até ser a própria (Stewart *et al.*, 2003).

A Tabela 17 exibe um resumo de todos os metais e tempos de retenção aproximados observados para fígado, rim e músculo de *P. blainvillei*. Para fígado e rim, os tempos de retenção observados foram de 11, 21 e 27 minutos, enquanto para músculo foram de 21, 25 e 27 minutos. A partir dessas observações é possível inferir que proteínas de elevado peso molecular tem maior afinidade com órgãos metabolicamente ativos (Lavradas *et al.*, 2016).

Tabela 17. Tempos de retenção para fígado, rim e músculo de *P. blainvillei*

Indivíduo	Tempo			
	11 minutos	21 minutos	25 minutos	27 minutos
P1 F	Hg, Pb	Cu, Hg, Ni, Pb, Ti	-	Cr
P2 F	Hg, Pb	Cu, Hg, Ni, Pb, Ti	-	-
P4 F	Hg	Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Cr
P6 F	Hg, Zn	Cu, Ni, Pb, Sn, Ti, Zn	-	Cr
P12 F	-	Co, Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Cr
P12 R	Cu, Pb, Zn	Cu, Ni, Pb, Zn, Ti	-	-
P3 M	-	Cu, Hg, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Cr
P5 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Cr
P7 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	As, Se	Cr
P8 M	-	Cu, Ni, Ti	-	-
P9 M	-	Cu, Hg, Ni, Ti	-	
P10 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti	-	Cr
P11 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Cr
P12 M	-	Cu, Ni, Ti, Zn	-	Cr

Uma vez que todas as amostras foram injetadas com a mesma quantidade de proteína (40 µg), é possível comparar as intensidades relativas de cada pico e, assim, inferir qual indivíduo apresentou maior concentração do analito. Para esta espécie, no geral, as intensidades observadas em fígado foram mais altas do que em rim e músculo. Na Tabela 18 é mostrado um resumo das intensidades relativas dos picos para todos os analitos que foram detectados em ao menos dois indivíduos.

Tabela 18. Intensidades relativas (em %) observadas para os analitos Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Ti e Zn em *P. blainvillei*

	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Ti	Zn		
Tempo (min)	27	21	11	21	21	11	21	21	
Indivíduo									
P1 F	83	30	5	46	13	61	56	46	-
P2 F	-	35	-	53	19	70	48	28	-
P4 F	73	51	17	-	100	-	100	58	19
P6 F	75	100	12	-	56	-	43	92	100
P12 F	97	12	-	-	18	-	32	54	5
P12 R	-	4	-	-	13	100	35	36	3
P3 M	100	6	100	-	21	65	-	35	4
P5 M	93	8	-	-	17	-	14	82	2
P7 M	10	5	-	-	12	-	25	100	3
P8 M	73	17	-	-	9	-	-	49	-
P9 M	-	21	-	100	11	-	-	27	-
P10 M	88	50	-	-	15	-	-	65	-
P11 M	66	11	-	-	14	-	57	59	3
P12 M	69	24	-	-	13	-	-	58	3

A partir dos dados da Tabela 18 é possível inferir que, devido à maior concentração de analitos no fígado, para esta espécie, destoxificação pela via metabólica da metalotioneína ocorreu em um dado momento. Esse comportamento é esperado, uma vez que o fígado é o órgão com maior potencial de biotransformação e eliminação de xenobióticos. Entretanto, para alguns analitos, o músculo apresentou concentrações relativas elevadas, indicando que, apesar da destoxificação mediada por metalotioneína, possivelmente houve bioacumulação nos indivíduos analisados (Souza *et al.*, 2018).

4.6.2. Metaloproteínas em *Steno bredanensis*

Os perfis cromatográficos para as frações termoestáveis de fígado, rim e músculo de *S. bredanensis* apresentaram algumas variações, entretanto, todos os elementos analisados eluíram entre 10 e 30 minutos, com exceção ao Hg, que apresentou tempos de eluição entre 10 e 40 minutos. Todas as amostras exibiram picos evidentes para Cu, Ni e Ti, assim como para Cr e Zn, também presentes na maioria das amostras. Elementos como Hg, Pb e Zn, também não estiveram presentes em todas as amostras e os picos observados para estes analitos foram menos intensos do que aqueles observados para Cu, Ni e Ti. Entre os indivíduos analisados, nove amostras dos três tecidos estudados não apresentaram associação entre Hg e proteínas, indicando que possivelmente este elemento quase não foi destoxificado por metaloproteínas. Para Se, picos consideravelmente pequenos foram observados, em apenas três indivíduos. O mesmo ocorreu para Cd (S7 M) e Fe (S7 M), que apresentaram picos apenas para um indivíduo e, ainda, não foram observados picos para As. Assim como para *P. blainvillei*, a quantidade de proteína injetada foi de 40 µg para todas as amostras, possibilitando, assim, fazer algumas comparações relativas à intensidade dos picos. As Figuras 23 a 25 mostram o perfil exibido por esses analitos nas amostras de fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*.

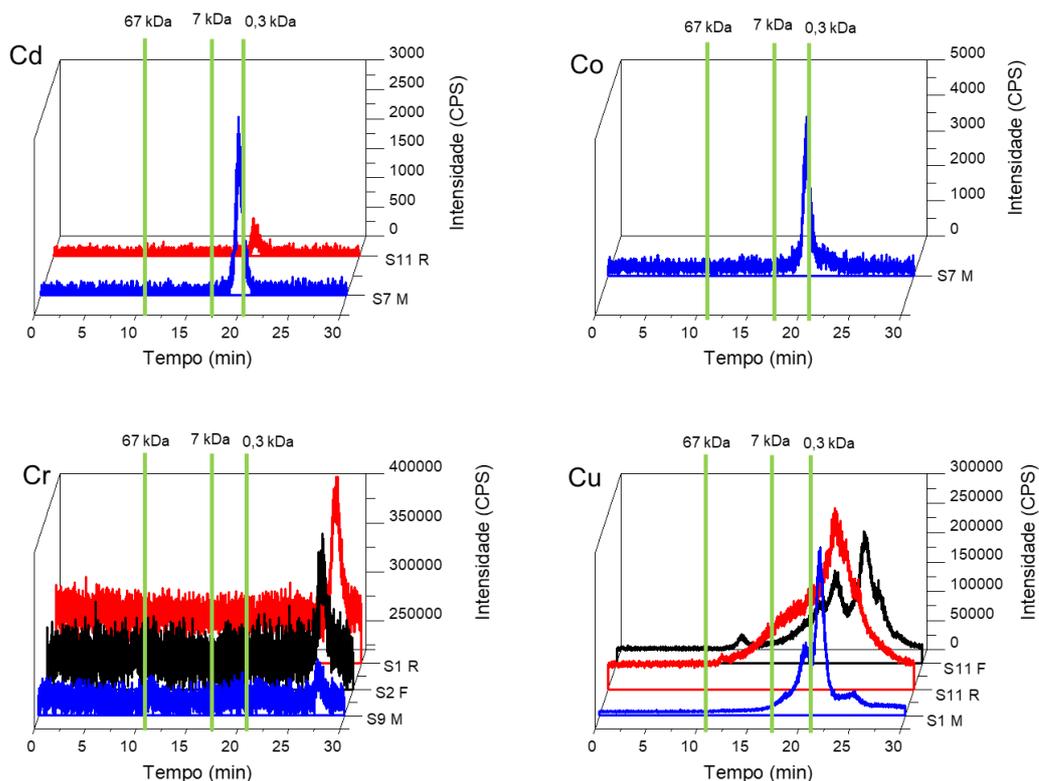


Figura 23. Proteínas ligadas a Cd, Co, Cr e Cu observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*. (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Apenas duas amostras apresentaram picos relativos ao Cd, sendo estes observados aproximadamente aos 21 minutos. A partir deste estudo é possível indicar uma possível ligação entre a GSH e o Cd. Como descrito anteriormente para *P. blainvillei*, o complexo Cd-GSH foi descrito por Jacquart *et al.* (2017) como sendo entalpicamente favorável em pH fisiológico e, conseqüentemente, uma parte do Cd presente nestes indivíduos foi destoxificado devido a esta interação. Similarmente ao Cd, apenas uma amostra apresentou pico relativo a Co, tendo este um tempo de retenção de aproximadamente 22 minutos. Como previamente descrito por Singh *et al.* (2001), é possível que parte do Co presente neste indivíduo esteja complexando com a GSH e, assim, realizando ao menos parcialmente a destoxificação deste metal.

Picos referentes a Cr em fígado, músculo e rim foram observados para maioria dos indivíduos analisados desta espécie. Os tempos de retenção observados para Cr foram, em todas as amostras, de aproximadamente 27 minutos, indicando que este elemento, possivelmente, está ligado a metaloproteínas de peso molecular inferior ao da GSH (0,3 kDa). Não foram encontrados na literatura estudos acerca da complexação de Cr com

metaloproteínas termoestáveis deste tamanho, corroborando a necessidade de estudos futuros a respeito do tema.

O pico relativo a Cu foi observado em todos os indivíduos analisados aos 21 minutos, indicando que possivelmente ocorreu complexação entre a GSH e este metal e, conseqüentemente, houve destoxificação, ao menos parcial, por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001). Aos 12 minutos, para rim e músculo, também foram apresentados picos relativos a Cu, sinalizando que este metal pode ter sido complexado por uma proteína de peso molecular próximo a 67 kDa e, desse modo, parcialmente destoxificado pela mesma (Inesi, 2017).

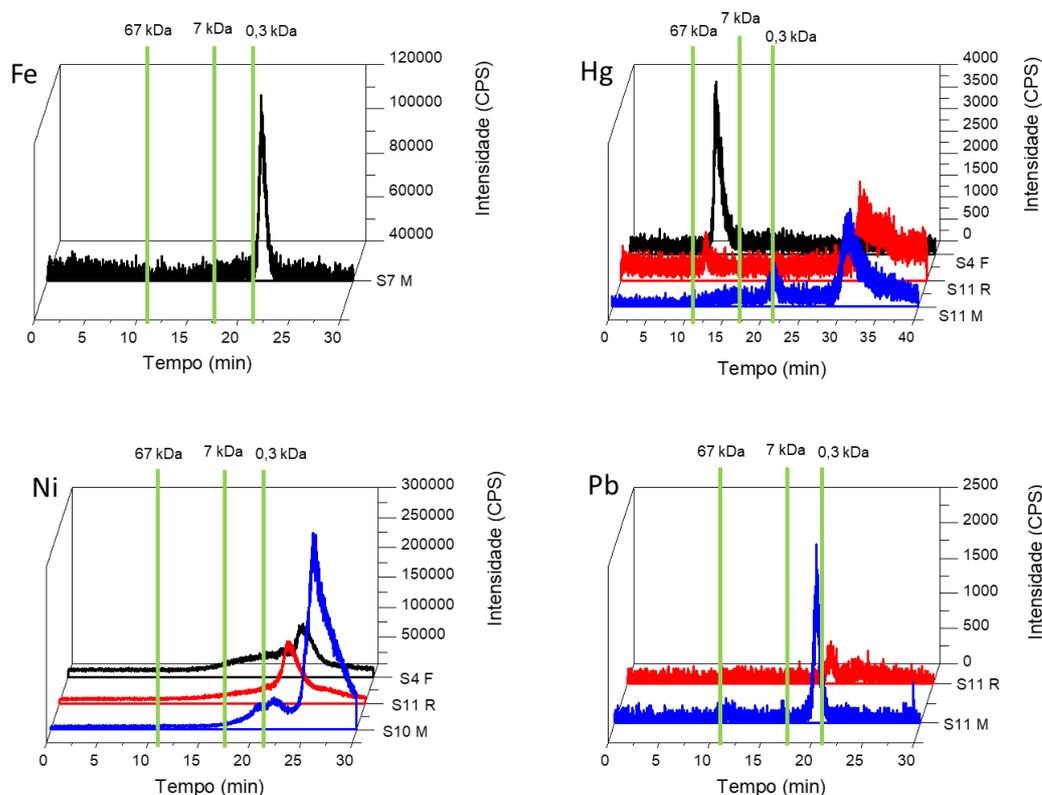


Figura 24. Proteínas ligadas a Fe, Hg Ni e Pb observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*. (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho)- Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Apenas o indivíduo S7 M apresentou pico relativo a Fe, com tempo de retenção de aproximadamente 21 minutos, indicando possível complexação entre a GSH e o analito (Berndt e Lillig, 2017), assim como uma destoxificação parcial deste por esta via metabólica.

Os perfis observados para Hg diferem entre os tecidos analisados, com apenas duas amostras de fígado, três de rim e quatro de músculo apresentando para este analito, picos ligados a proteína. Os tempos de retenção de

aproximadamente 11 minutos observados para fígado indicam a possibilidade de destoxificação neste tecido, por meio da complexação de Hg com a metaloproteína em questão, cujo peso molecular, considerando que o tempo de retenção de registrado se assemelha ao do padrão de BSA, é próximo a 67 kDa (Li *et al.*, 2018). Por outro lado, os tempos de retenção observados em tecido muscular foram de aproximadamente 21 e 35 minutos, indicando complexação entre Hg e GSH e destoxificação por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001), além da possível complexação com uma metaloproteína de peso molecular inferior ao da GSH. No rim, foram observados tempos de retenção de aproximadamente 11 e 35 minutos, indicando tanto complexação com metaloproteínas de peso molecular semelhante à BSA (67 kDa) e inferior a 0,3 kDa, respectivamente.

Analogamente ao observado para Cu, foram verificados picos relativos a Ni em todas as amostras analisadas, que apresentaram o primeiro pico aproximadamente aos 21 minutos, indicando possível complexação entre este metal e a GSH e, conseqüentemente destoxificação, ainda que parcial, por esta via metabólica (Singh *et al.*, 2001). Para músculo foram observados, também, picos aproximadamente aos 27 minutos, possivelmente atribuídos a metaloproteínas de peso molecular inferior a 0,3 kDa

Os resultados auferidos indicam a necessidade estudos futuros a respeito da termoestabilidade de metaloproteínas e possíveis vias de destoxificação, uma vez que, para proteínas menores que 0,3 kDa, não foram encontrados estudos na literatura que permitam inferências e paralelos mais profundos a respeito do tema.

As três amostras de rim e nove das amostras de músculo apresentaram picos de Pb aproximadamente aos 21 minutos, o mesmo tempo de retenção da GSH no padrão. De acordo com estudos conduzidos por Jacquart *et al.* (2017), a complexação entre GSH e Pb é entalpicamente favorável, ou seja, o efeito tóxico deste metal possivelmente foi reduzido por essa reação. Uma vez que não foram verificados picos para as amostras de fígado, pode ser inferido que a destoxificação deste metal, em tecido hepático, ocorre majoritariamente por outras vias metabólicas.

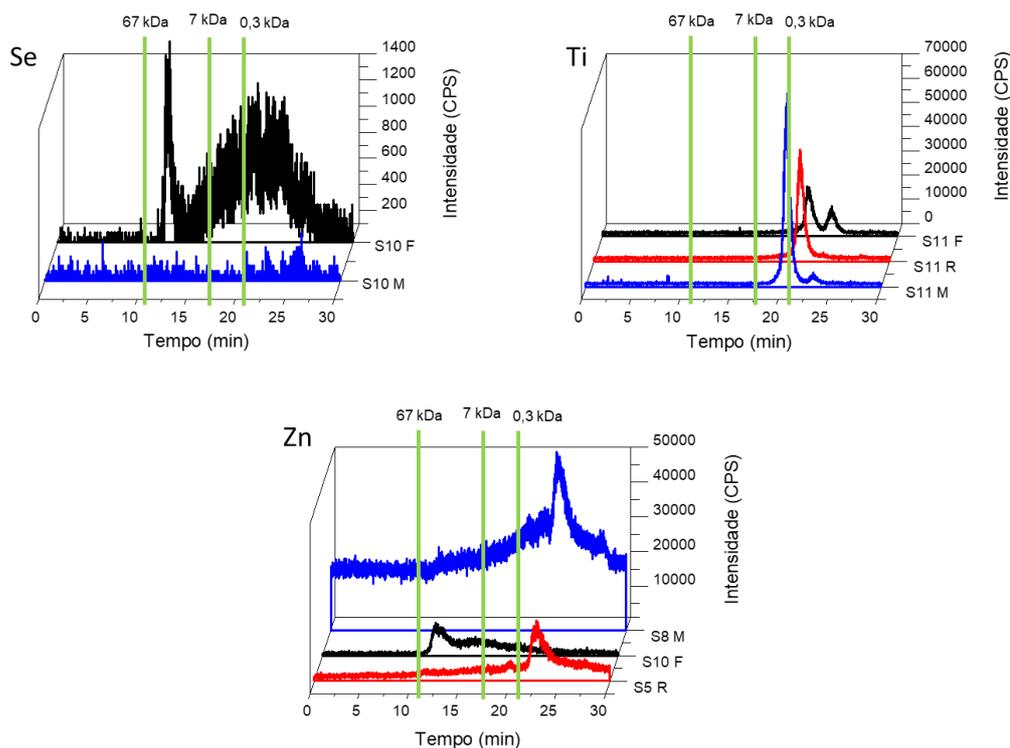


Figura 25. Proteínas ligadas a Se, Ti e Zn observadas por SEC-HPLC-ICP-MS em fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*. (F) (preto) Fígado, (R) (azul) Rim, (M) (vermelho) Músculo. Os tamanhos de proteína contidos no padrão são: BSA (67 kDa), MT (7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

Foram observados picos relativos a Se em três amostras de fígado e uma amostra de músculo, com baixa intensidade, indicando a baixa concentração desse analito nos indivíduos estudados. No fígado foram observados dois picos para Se, o primeiro aproximadamente aos 11 minutos e o segundo aos 21 minutos. O primeiro pico indica complexação de Se com uma metaloproteína de peso molecular próximo a 67 kDa (peso molecular do padrão de BSA), já o segundo pico indica complexação com a GSH e possível destoxificação por esta via metabólica. O pico de Se em músculo, observado aos 25 minutos, foi consideravelmente pequeno, sendo que de acordo com literatura, neste tempo de retenção Se pode estar na forma de Se–metionina (0,2 kDa) ou Se–uréia (0,1 kDa) (Pizarro *et al.*, 2004).

Foram verificados picos de altas intensidades para Ti, em quase todas as amostras analisadas, o que indica haver contaminação por este analito em todos os indivíduos. O tempo de retenção observado foi de aproximadamente 21 minutos, o que indica uma possível complexação entre Ti e GSH. Uma vez Ti é um contaminante emergente, a literatura versando a respeito da formação do complexo Ti-GSH é limitada, o que evidencia a necessidade e importância da

condução de novos estudos para a caracterização das proteínas ligadas a este metal.

Nas amostras de rim e músculo, o tempo de retenção observado para Zn foi de aproximadamente 21 minutos, da mesma forma que para o padrão de GSH. O complexo formado entre Zn e GSH é estável e de extrema importância para os sistemas biológicos (Zhou *et al.*, 2012), sendo que este pode ter auxiliado o processo de destoxificação de Zn. No fígado, o tempo de retenção observado foi de 11 minutos, indicando que, neste tecido uma parte do Zn está complexado com uma proteína de tamanho próximo a albumina (67 kDa), podendo até mesmo ser a própria (Stewart *et al.*, 2003).

Na Tabela 19 é mostrado um resumo de todos os metais, e seus respectivos tempos de retenção aproximados, observados para fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*. Em todos os tecidos analisados foram observados picos em 11, 21, 27 e 35 minutos, sendo interessante ressaltar que nem todos os indivíduos apresentaram picos relativos à metais em 11, 27 e 35 minutos.

Tabela 19. Tempos de retenção observados para fígado, rim e músculo de *S. bredanensis*

Indivíduo	Tempo			
	11 minutos	21 minutos	27 minutos	35 minutos
S1 F	-	Cu, Ni, Se, Ti	-	-
S2 F	-	Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	-
S4 F	Hg	Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	-
S9 F	Cu	Cu, Ni, Ti	Cr	-
S10 F	Hg, Se, Zn	Cu, Ni, Se, Ti, Zn	Cr	-
S11 F	Cu	Cu, Ni, Ti	Cr	-
S12 F	-	Cu, Ni, Ti	Cr	-
S13 F	Hg	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	Hg
S1 R	-	Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	-
S5 R	-	Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	Hg
S11 R	Cu, Hg	Cd, Cu, Ni, Pb, Ti	Cr	Hg
S3 M	Cu	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	-
S5 M	Hg	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	Hg
S6 M	-	Co, Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	-
S7 M	-	Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	-
S8 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	-
S9 M	-	Co, Cu, Ni, Ti, Zn	Cr	Hg
S10 M	-	Cu, Ni, Pb, Se, Ti	Cr	-
S11 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	-	Hg
S12 M	Cu	Cu, Hg, Ni, Ti, Zn	Cr	Hg
S13 M	-	Cu, Ni, Pb, Ti, Zn	Cr	-

Assim como para *P. blainvillei*, foi injetada a mesma quantidade de proteína para todas as amostras (40 µg), assim as mesmas comparações realizadas anteriormente para *P. blainvillei* foram feitas para *S. bredanensis*. No geral, as intensidades observadas em músculo foram mais altas do que em rim e fígado. Na Tabela 20 é mostrado um resumo das intensidades relativas observadas para todos os analitos que apresentaram ao menos dois picos.

Tabela 20. Intensidades relativas (em %) observadas para os analitos Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Ti e Zn em *S. bredanensis*

	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Se	Ti	Zn		
Tempo (min).	21	21	27	11	21	11	35	21	21	21		
Indivíduo												
S1 F	-	-	-	-	10	-	-	10	-	41	21	-
S4 F	-	-	71	-	17	13	-	27	-	-	8	1
S9 F	-	-	70	48	30	-	-	15	-	-	13	-
S10 F	-	-	71	-	50	100	-	15	-	100	23	-
S11 F	-	-	67	47	47	-	-	10	-	-	10	1
S12 F	-	-	68	-	30	-	-	11	-	-	15	3
S1 R	-	-	100	-	41	-	-	9	-	-	22	-
S5 R	-	-	93	-	93	-	-	32	-	-	44	1
S11 R	21	-	82	60	27	5	54	7	3	-	21	10
S3 M	-	-	71	100	70	-	-	14	3	-	15	8

Tabela 20. Continuação. Intensidades relativas (em %) observadas para os analitos Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Ti e Zn em *S. bredanensis*.

	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Se	Ti	Zn		
Tempo (min)	21	21	27	11	21	11	35	21	21	21		
Indivíduo	21	21	27	11	21	11	35	21	21	21		
S5 M	-	-	75	-	69	3	32	21	5	-	21	5
S6 M	-	32	81	-	100	-	-	17	-	-	43	13
S8 M	-	-	67	-	31	-	-	8	7	-	13	-
S9 M	-	-	95	-	52	-	-	100	-	-	32	5
S10 M	-	-	85	-	86	-	-	6	10	29	38	5
S11 M	-	-	-	-	6	-	-	4	10	-	4	5
S12 M	-	-	92	29	14	-	55	6	-	-	20	5
S13 F	-	-	91	-	12	-	100	4	9	-	5	100
S13 M	-	-	9	-	13	-	-	4	9	-	5	12
S7 M	100	100	82	-	33	-	-	6	100	-	100	-
S2 F	-	-	92	-	13	-	-	10	-	-	13	-

A partir dos dados mostrados na Tabela 11 pode ser observado que, embora tenha ocorrido destoxificação pela via metabólica da metalotioneína, para a maior parte dos indivíduos foi observado um grande acúmulo dos analitos no músculo. Isso indica uma possível bioacumulação destes analitos nos indivíduos analisados, assim como uma possível sobrecarga dos órgãos metabolicamente ativos como fígado e rim, indicando que estes podem não ter sido capazes de destoxificar de forma efetiva os contaminantes. Sendo o músculo um tecido com maior capacidade de acumular do que de excretar xenobióticos, possivelmente estes contaminantes se acumularam neste tecido (Souza *et al.*, 2018).

4.7. Comparações entre *P. blainvillei* e *S. bredanensis*

Foram observadas diversas diferenças entre as distribuições subcelulares observadas para *P. blainvillei* e *S. bredanensis*, entre as quais pode ser mencionado o acúmulo de Ag, Hg e Sn em PPT em alguns indivíduos de *S. bredanensis*, ao passo que, para As, foi observado um maior acúmulo em PPT, assim como Cd e Cr em FTE em *P. blainvillei*. Também foi observada uma maior concentração relativa de Al em FTL em *P. blainvillei*, enquanto para *S. bredanensis* foi observada, em alguns indivíduos, uma maior quantidade relativa em FTE para esse analito. Para os analitos Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Ti e Zn, não foram observadas diferenças significativas entre as distribuições subcelulares.

As diferenças observadas são provenientes, possivelmente, de diferenças nas fontes de contaminação, tais como habitat e alimentação, dado que a *P. blainvillei* é encontrada apenas na costa do Oceano Atlântico, na América do Sul, enquanto *S. bredanensis* é encontrado entre os trópicos, em todos os oceanos, tanto em águas costeiras quanto em alto mar. Ainda, é relevante apontar que os espécimes de *P. blainvillei* foram considerados jovens, a partir de seu tamanho, conseqüentemente pode ser inferido que sua alimentação era composta, majoritariamente, por pequenos crustáceos, por outro lado os espécimes de *S. bredanensis* foram considerados adultos, utilizando o mesmo parâmetro e, entre seus alimentos preferidos, estão moluscos, como por exemplo lulas, reconhecidamente fontes de Cd por ingestão.

Devido às diferenças encontradas nas distribuições subcelulares entre as espécies estudadas, foi também realizado um PCA comparando ambas, de forma que foi possível observar como as espécies se correlacionam. A análise discriminante em PPT para *S. bredanensis* e *P. blainvillei* foi realizada usando as

concentrações de MT, GSH e metais no fígado, rim e músculo e esta é mostrada na Tabela 21. Quatro funções significativas foram detectadas.

Tabela 21. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de elementos em fígado, rim e musculo de *S. bredanensis* e *P. blainvillei* em PPT.

Função de discriminação	1	2	3	4
Autovalor	6,14	2,60	1,64	1,34
Variância total	38,40	16,24	10,25	8,36

Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados			
Al	-0,42	-0,29	-0,12	0,46
V	-0,44	-0,31	0,25	0,23
Cr	-0,43	-0,81	-0,25	-0,10
Mn	-0,85	0,06	0,20	0,16
Fe	-0,67	0,09	0,12	-0,44
Ni	-0,40	-0,83	-0,30	0,01
Cu	-0,88	-0,09	0,01	0,05
Zn	-0,75	0,42	-0,36	-0,29
As	-0,58	-0,21	0,54	-0,16
Se	-0,56	0,49	-0,54	-0,26
Ag	-0,80	0,14	0,05	0,38
Cd	-0,28	-0,03	0,45	-0,39
Hg	-0,82	0,36	-0,31	0,01
Pb	-0,05	-0,67	-0,25	-0,45
Ti	-0,58	0,07	0,53	-0,21
Sn	-0,74	0,05	-0,05	0,33

Os analitos Mn, Fe, Cu, Zn, Ag, Hg e Sn (-0,85, -0,67, -0,88, -0,75, -0,80, -0,82 e -0,74, respectivamente) exibiram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminatório da Função 1. O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos, em que Cr e Pb apresentaram os maiores coeficientes (-0,81 e -0,67), respectivamente. Os gráficos de dispersão para

ambos os tecidos são exibidos na Figura 26. Os rins e músculos foram agrupados, enquanto algumas amostras de fígado de *S. bredanensis* se mantiveram separadas.

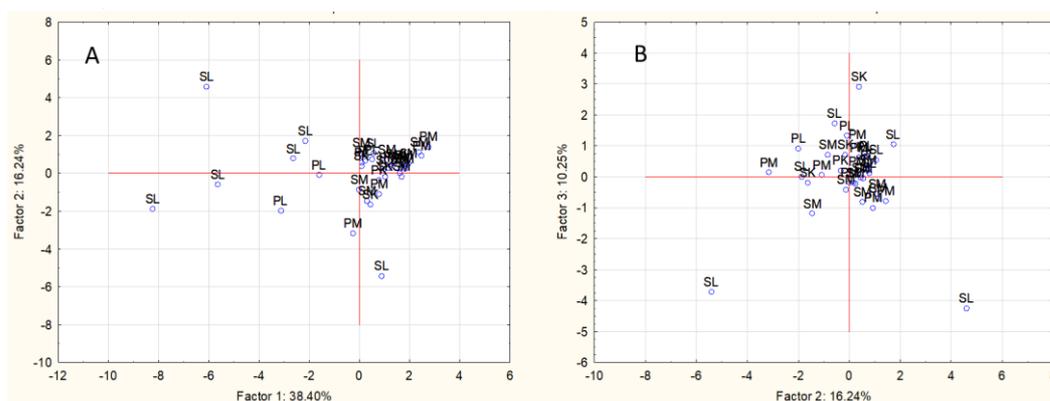


Figura 26.. Gráficos de dispersão para a função de discriminação de tecidos musculares, renais e hepáticos de PM e SM. (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. SM - *Steno bredanensis* músculo, SL - *Steno bredanensis* fígado, PM - músculo *Pontoporia blainvillei*, PL - fígado *Pontoporia blainvillei*.

Associações significativas entre elementos não-essenciais e essenciais foram detectadas no PPT pelo PCA. A associação de metais não-essenciais, Hg, Ag e Sn, com Cu, Mn, Fe e Zn, pode indicar papéis protetores contra esses metais não-essenciais. Como mencionado anteriormente, existem estudos acerca do possível efeito protetor de Fe e Zn contra a toxicidade de Hg, sendo normalmente realizados em ratos estes estudos (Land *et al.*, 2018). No entanto, dados escassos as outras interações citadas em organismos superiores estão disponíveis. Novos estudos a esse respeito são necessários em mamíferos marinhos, uma vez que existe uma lacuna significativa na literatura para esse elemento nesses animais.

A Função 2 indica, ainda, associações com Cr e Pb, embora em menor grau. Associações entre Zn e Hg e Se e Hg foram detectadas na FTE (discutido adiante), e a presença de associações semelhantes na fração PPT pode indicar que possíveis efeitos protetores já existam antes da desintoxicação da MT. Dessa forma, é possível observar que ambas as espécies apresentam mecanismos de detoxificação parecidos para alguns elementos.

A análise discriminante de FTL em *S. bredanensis* e *P. blainvillei* foi realizada usando as concentrações de MT, GSH e metais no fígado, rim e músculo. Não foi possível observar fatores de significância estatística, o que indica que a análise de FTL não é adequada para inferir contaminação diferencial entre as espécies estudadas devido ao baixo número de amostras.

A análise discriminante de FTE em fígado e músculo de *S. bredanensis* e *P. blainvillei* foi realizada utilizando as concentrações de MT, GSH e metais, que

estão apresentadas nas Tabela 22 e 23. Três funções significativas foram detectadas.

Tabela 22. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em músculo de *S. bredanensis* e *P. blainvillei* em FTE

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	5,82	2,70	2,10
Variância total	38,81	18,01	14,01

Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
MT	-0,15	0,69	0,42
GSH	-0,71	0,56	0,02
Al	0,45	-0,22	0,09
Cr	-0,61	0,28	-0,43
Mn	-0,75	-0,58	-0,13
Fe	-0,71	0,43	-0,38
Ni	0,10	-0,52	0,03
Cu	0,51	0,12	-0,73
Zn	0,04	-0,25	-0,56
As	-0,79	-0,57	-0,09
Se	0,59	0,40	-0,58
Cd	0,86	-0,19	0,37
Hg	0,67	-0,23	-0,49
Pb	-0,77	-0,57	-0,07
Ti	-0,80	0,19	-0,05

Tabela 23. Resultado obtido pela Função de discriminação para a análise de MT, GSH e elementos em fígado de *S. bredanensis* e *P. blainvilei* em FTE

Função de discriminação	1	2	3
Autovalor	1,29	0,90	0,66
Variância total	33,01	29,01	15,58
Variáveis	Coeficientes de Função de discriminação padronizados		
MT	-0,21	0,81	-0,33
GSH	-0,63	0,54	-0,43
Al	0,67	-0,28	0,40
Cr	-0,58	-0,15	-0,60
Mn	0,01	-0,90	0,08
Fe	-0,68	-0,22	-0,47
Ni	0,57	0,01	-0,39
Cu	0,50	-0,41	-0,58
Zn	0,64	0,18	-0,67
As	-0,15	-0,97	-0,04
Se	0,85	-0,18	-0,42
Cd	0,29	0,69	0,12
Hg	0,88	-0,21	-0,28
Pb	-0,31	-0,75	-0,02
Ti	-0,77	-0,43	-0,28

Para músculo, Cd, Ti, As, Pb, Mn, Fe e GSH (0,86, -0,79, -0,78, -0,76, -0,74, -0,71 e -0,70, respectivamente) apresentaram os maiores coeficientes e contribuíram mais para o poder discriminatório da Função 1. O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos, onde MT apresentou o maior coeficiente (0,69). Para o fígado, Hg, Se, Ti, Fe, Al, Zn e GSH apresentaram os maiores coeficientes (0,88, -0,85, -0,76, -0,68, 0,66, -0,63, -0,63, respectivamente), e contribuíram mais ao poder discriminatório da Função 1 (Tabela 23). O poder da Função 2 permitiu maior discriminação entre os tecidos,

onde As, Mn, MT, Pb e Cd apresentaram os maiores coeficientes (-0,96, -0,90, 0,81, -0,74 e 0,69, respectivamente). Ambos os tecidos foram consistentemente separados por espécie. Os rins não foram incluídos devido ao baixo número de amostras. Os gráficos de dispersão para ambos os tecidos são exibidos na Figura 27.

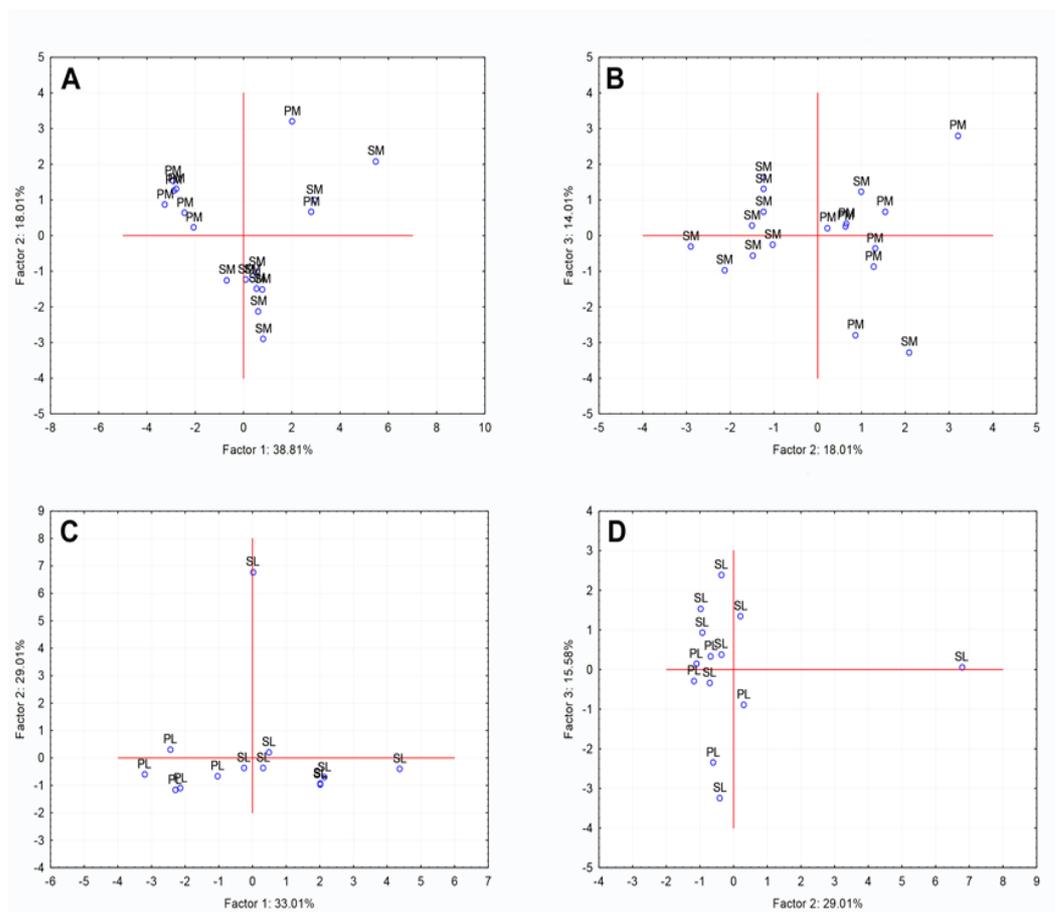


Figura 27. Gráficos de dispersão para a discriminação de tecidos musculares e hepáticos de PM e SM. Músculo: (A) Função 1 versus Função discriminante 2, (B) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. Fígado: (C) Função 1 versus discriminante Função 2, (D) Função discriminante 2 versus Função discriminante 3. SM - *Steno bredanensis* músculo, SL - *Steno bredanensis* fígado, PM - músculo *Pontoporia blainvillei*, PL - fígado *Pontoporia blainvillei*.

No músculo, esses resultados indicam que o GSH associado a As, Pb, Mn, Cd, Fe e Ti na fração de TSF é capaz de discriminar com precisão entre fígado e músculo devido à contaminação diferencial de metal e é, portanto, um biomarcador útil em estudos de biomonitoramento. A associação entre essas variáveis é interessante, pois a GSH, neste caso, parece estar lidando com o estresse oxidativo causado por esses metais presentes na Função 1. Além disso, a MT presente na Função 2 indica a ligação e detoxificação de As, Pb, Mn, Cd, Fe e Ti, como relatado em estudos anteriores para este tecido em mamíferos marinhos (Waalkes *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2017).

No fígado, estes resultados indicam associações de GSH com Hg, Se, Ti, Fe, Al, Zn e GSH, na mesma tendência discutida acima, com a inclusão de Hg, Se, Al e Zn. A presença de uma associação entre Se e Hg é interessante, uma vez que Se é conhecido por exibir um efeito protetor contra Hg (discutido na seção 4.5.3 deste estudo), novamente incluindo MT e outros metais (As, Mn, Pb e Cd). O número crescente de metais presentes na PCA no fígado é esperado, já que o fígado acumula quantidades maiores de metais que músculos, devido às suas funções detoxificantes. Além disso, uma associação entre MT e Zn é esperada, pois este é um dos principais elementos para se ligar à MT, a fim de manter a homeostase da função celular diversificada, enquanto as associações com As, Mn, Pb e Cd indicam a ligação MT e desintoxicação, como relatado em estudos anteriores para este tecido em mamíferos marinhos (Waalkes *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2017).

Assim, a FTE é uma escolha interessante em relação às avaliações da via de desintoxicação mediada por MT em *P. blainvillei* e *S. bredanensis*, podendo elucidar ainda mais os mecanismos bioquímicos e a ligação específica entre espécies e inter-espécies de metal-MT.

Assim como as distribuições subceulares e PCA, também foram observadas diferenças entre as correlações de Spearman entre as duas espécies. *S. bredanensis* apresentou apenas uma correlação significativa entre dois metais essenciais (Cu e Se) sendo, também, a única espécie que apresentou relação entre Ti e outro metal, no caso Cd, e uma correlação entre Se e Hg, sendo esta uma relação já bem conhecida na literatura.

Dentre os efeitos protetores postulados, foi observada uma diferença quanto aos metais não-essenciais. Para *P. blainvillei*, foram observados possíveis efeitos protetores dos metais essenciais contra As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb, ao passo que, para *S. bredanensis*, esses efeitos foram observados apenas para Cd, Hg e Ni. Essas diferenças indicam que podem existir mecanismos de proteção distintos contra metais não-essenciais para cada espécie, sendo que isso também pode depender dos níveis de contaminação a que os indivíduos foram expostos.

Finalmente, foram também observadas diferenças entre as rotas metabólicas de destoxificação para as espécies estudadas, uma vez que foram encontrados tanto analitos diferentes quanto tempos de retenção diferentes para o mesmo analito. Os analitos Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Ti e Zn foram encontrados para pelo menos um indivíduo tanto para *P. blainvillei* quanto para *S. bredanensis*, entretanto As e Sn foram detectados apenas em algumas amostras de *P. blainvillei*, enquanto Fe apenas em algumas amostras de *S. bredanensis*.

As diferenças observadas nos diferentes tempos de retenção, para o mesmo analito, foram: Pb (11 minutos) e Se (25 minutos) em *P. blainvillei*, assim como para Se (11 minutos), Se (21 minutos) e Hg (35 minutos) para *S. bredanensis*. Uma vez que diferentes tempos de retenção indicam diferentes ligações entre metais e proteínas, podemos assumir que cada uma das espécies estudadas tem seus mecanismos próprios para realizar a destoxificação de metais. É importante também ressaltar que essas diferenças também podem ocorrer devido aos diferentes níveis de contaminantes aos quais os indivíduos foram expostos, diretamente relacionados com os hábitos de cada espécie.

5. Conclusões

A MT pode ser considerada como um bom biomarcador de exposição a metais, uma vez que ela está relacionada com a destoxificação de metais não-essenciais e homeostase de metais essenciais. Não foi observada correlação significativa entre a MT e GSH, para nenhuma das espécies, dessa forma concluiu-se que a MT não está relacionada ao estresse oxidativo. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações de MT nos tecidos analisados para as duas espécies, assim como para GSH em *P. blainvillei*. Por outro lado, foi observada uma diferença significativa entre GSH de fígado e músculo em *S. bredanensis*. As concentrações obtidas para o fígado foram mais elevadas do que as do músculo, isso já era esperado, uma vez que o fígado é um órgão metabolicamente ativo, além deste ser o principal responsável pela destoxificação no organismo.

Com o presente estudo foi possível acrescentar novas informações, assim como complementar informações pré-existentes, acerca do acúmulo de metais (Ag, Al, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ti e Zn) em fígado, rim e músculo de pequenos cetáceos do Atlântico Sul. As distribuições subcelulares destes elementos mostram que *P. blainvillei* e *S. bredanensis* realizaram destoxificação parcial destes contaminantes, no entanto também foi observado a acumulação dos mesmos. Por este estudo também foi possível concluir que os animais que habitam a região costeira do estado do Rio de Janeiro, como os golfinhos, estão expostos a diversos contaminantes, dentre eles os metais e metaloides, considerando sempre que os indivíduos analisados podem ser costeiros ou costeiros e oceânicos, a depender das particularidades de cada espécie.

Em *P. blainvillei*, foram observadas altas concentrações de alguns elementos como Al, As, Cd, Cr, Mn, Pb e Ti nas frações termolábil e termoestável de todos os tecidos avaliados para essa espécie, o que indica que grande parte destes analitos está sofrendo destoxificado pela via metabólica da MT, GSH ou outras proteínas e compostos não enzimáticos. Alguns outros elementos, como Ag, Cu, Fe, Hg, Ni, Se, Sn e Zn, apresentaram a maior parte de sua concentração na fração insolúvel, indicando que, provavelmente estes analitos utilizam de outras vias de destoxificação. Em *S. bredanensis*, alguns elementos, como Al e Cr foram encontrados principalmente na fração insolúvel.

Utilizando uma análise de componentes principais, foi possível observar diversas correlações estatisticamente significativas entre elementos não-

essenciais e essenciais para PPT e FTE em *P. blainvillei*. Para *S. bredanensis* todas as frações subcelulares, apresentaram correlações estatisticamente significativamente. Por conta dessas interações, alguns efeitos protetores foram postulados de elementos essenciais contra elementos não-essenciais, sendo que estes foram avaliados a partir dos cálculos de razões molares.

Os perfis observados para as metaloproteínas da FTE destes indivíduos foram amplamente variados, apresentando tempos de retenção variados para o mesmo analito em diferentes decidos e espécies. A partir desses dados foi postulada uma possível perturbação da homeostase dos elementos essenciais, assim como tentativas de desintoxicação de metais não-essenciais por diversas metaloproteínas. No entanto são necessários estudos mais aprofundados com relação à caracterização da expressão de metaloproteínas e seus mecanismos de destoxificação, assim como em sua identificação por espectrometria de massa uma vez que várias proteínas que apareceram relacionadas a metais neste estudo ainda não foram propriamente caracterizadas.

Referências bibliográficas

ACS Green Chemistry Institute. Disponível em: <<http://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

Amorim, L.C.A. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, Belo Horizonte. v. 1, n. 2, p.124-132, 2003.

Analytik Jena. Disponível em <www.analytik-jena.de>. Acesso em: 30 de março de 2018.

ANP, 2018. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2010. Seção 2: Indústria Nacional do Petróleo e Gás Natural**. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018> > Acesso em: 18 dez. 2018.

Asztemborska, M.; *et al.* Titanium dioxide nanoparticle circulation in an aquatic ecosystem. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 229, p. 208-217, 2018.

Augier, H.; Park, W.K. e Ronneau, C. Mercury contamination of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, from the French Mediterranean coasts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 306-310, 1993.

Bagliano, R.G. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**. v. 2, n.1. p. 29, 2012.

Baird, C. **Química Ambiental**. 2ª Ed. Porto Alegre: Bookman, p. 622, 2002.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

Bastos, F. F. *et al.* Melatonin affects conjugation of 4-hydroxynonenal with glutathione in liver of pacu, a hypoxia-tolerant fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 15-19, 2013.

Beck, K. M.; Fair, P.; Mcfee, W. e Wolf, D.; Heavy Metals in Livers of Bottlenose Dolphins Stranded along the South Carolina Coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 9, p. 734-739, 1997.

Bennett, P.M. *et al.* Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbor porpoises from England and Wales. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 33-40, 2001.

Berndt, C.; Lillig, C. H. Glutathione, glutaredoxins, and iron. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 27, n. 15, p. 1235-1251, 2017.

Blunden, S.; Wallace, T. Tin in canned food: a review and understanding of occurrence and effect. **Food and Chemical Toxicology**. v. 41, n. 12, p. 1651–1662, 2003.

Boss, C. B.; Fredeen, K. J. **Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. 2 ed. Perkin-Elmer corporation, 1997.

Campos, C. C. R.; CAMARA, I. G.; PRETTO, D. J. **Plano de Acao Nacional para a conservacao dos mamiferos marinhos - pequenos cetáceos**. DIRETORIA DE PESQUISA, A. E. M. D. B. C. G. D. M. P. C. Brasília: Ministerio do Meio Ambiente. Serie Especies Ameacadas no 18: 129 p. 2011.

Canesi, L. *et al.* Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 67-76, 1999.

Censi, P. *et al.* Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. **Chemosphere**. v. 64, n. 7, p. 1167-1176, 2006.

Chaves, E. S. **Determinação de elementos traço em diesel e biodiesel por espectrometria de emissão atômica em chama e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra por vaporização eletrotérmica**. 2008. 145 p. (Doutorado em Química). Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio 2008.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 6ª Ed. Campinas: Unicamp, p. 279, 1995.

Conceição, G. **Distribuição de elementos-traço em sedimentos superficiais do Rio Itajaí-Mirim em Santa Catarina**. 2004. 108 p. (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

Conick, H. C. Lead-binding proteins: a review. **Journal of Toxicology**, v. 2011, 2011.

Costa, C. R. C. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

Damasceno, D. C. *et al.* Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3-4, p. 235-244, 2002.

Decataldo, A. *et al.* Association of metals (mercury, cadmium and zinc) with metallothionein-like proteins in storage organs of stranded dolphins from the Mediterranean sea (Southern Italy). **Journal of Environmental Monitoring**, v.6, p. 361-367, 2004.

Elgaml, S. A. *et al.* Protective effects of selenium and alpha-tocopherol against lead-induced hepatic and renal toxicity in *Oreochromis Niloticus*. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v.6, n.1, 2015.

Elliott, M.; Griffiths, A. H.; Taylor, C. J. L. The role of fish studies in estuarine pollution assessment. **Journal of Fish Biology**, v. 33A, p.51-62, 1988.

Emiko Nakazawa, E. *et al.* Silver speciation in liver of marine mammals by synchrotron X-ray absorption fine structure and X-ray fluorescence spectroscopies. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1678-1686, 2011.

Esteves, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1988. 574 p.

Eybl, V.; Kotyzová, D. Protective effect of manganese in cadmium-induced hepatic oxidative damage, changes in cadmium distribution and trace elements level in mice. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 2, p. 68–72, 2010.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 61-68, 1997.

Filipovi, V.; Raspor, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, v. 37, p. 3253-3262, 2003.

Flora, S. J. S.; *et al.* Protective role of trace metals in lead intoxication. **Toxicology Letters**, v.13, p.51-56, 1982.

Förstner, U. **Lecture notes in Earth Sciences: contaminated sediments**. Springer: Verlag, 1999

Freire, M. M. *et al.* Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 347-354, 2008.

Baptista, G. *et al.* Mercury, selenium and stable isotopes in four small cetaceans from the Southeastern Brazilian coast: Influence of feeding strategy. **Environmental Pollution**, n.218, p. 1298-1307, 2016.

Ganger, R.; *et al.* Protective effects of zinc against acute arsenic toxicity by regulating antioxidant defense system and cumulative metallothionein expression. **Biological Trace Element Research**, v. 169, n. 2, p. 218–229, 2015.

Garcia de Araújo, W. A.; Assis Junior, F. I.; Sobreira, G. F. Fundamentos e métodos para análises de aminoácidos. **Nutritime**, v. 4, n. 2, p. 395-404, 2007.

Garcia-Sevillano, M. A. *et al.* Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 1967-1981, 2012.

Gil, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2ª Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

Giné, F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, Universidade de São Paulo – USP, 1998.

Giné-Rosias, M. F. **A espectrometria de massas com fonte de plasma ICP-MS**. 1ª Ed. Piracicaba: CPG-CENA-USP, 1999.

González-Fernández, M. *et al.* Metal-binding molecules in the organs of *Mus musculus* by size-exclusion chromatography coupled with UV spectroscopy and ICP-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 17-28, 2008.

González-Fernández, M. *et al.* Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, p. 141-149, 2011.

Gore, M. G. **Spectrophotometry and Spectrofluorimetry**. 2^a Ed. Oxford University Press, 2000. 368 p.

Gray, J.S. Biomagnification in marine Systems: the perspective of an ecologist. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 46-52, 2002.

Halder, G. *et al.* Chronic arsenic toxicity with and without excess supplementation of methionine on the performance and metabolizability of nutrients in layer chicken. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 1, p. 18-25, 2007.

Hauser-Davis, R. A. **Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em Mugil liza, Geophagus brasiliensis e Tilapia rendalli**. 2008. 128 p. (Mestrado em Química) – Departament de Química, PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2008.

Hauser-Davis, R. A. *et al.* A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**, v. 116, p. 54-60, 2012.

Hauser-Davis, R. A. *et al.* Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1. p. 70-74, 2013.

Hauser-Davis, R.A. *et al.* Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 24-28, 2014.

Hermes-Lima, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. Em: Storey, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New York: John Wiley & Sons, 2004. p.319–368.

Huber, P. C.; Almeida, W. P.; de Fatima, A. Glutathione and related enzymes: Biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

Inesi, G. Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis. **IUBMB Life**, v. 39, n. 4, p. 211-217, 2017.

Inmetro. Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. **DOQ-CGCRE-008**. 2016.

De Moura, J.F. *et al.* Dolphins (*Sotalia guianensis*) as Marine Ecosystem Sentinels: Ecotoxicology and Emerging Diseases. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 228, p. 1-29, 2014.

Jacquart, A. *et al.* Cd²⁺ and Pb²⁺ complexation by glutathione and the phytochelatin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 267, p. 2-10, 2017.

Jamakala, O.; Rani, A. U. Mitigating role of zinc and iron against cadmium induced toxicity in liver and kidney of male albino rat: a study with reference to metallothionein quantification. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 9, p. 411-417, 2014.

Jarvis, K. E.; Gray, L. A.; Houk, R. S. **Handbook of Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry**. New York: Blackie, 1992. 380 p.

Jefferson, T.; Webber, M.; Pitman, R. **Marine Mammals of the World**. 2ª Ed. Elsevier, 2015. 616 p.

Jerez, S. *et al.* Monitoring trace elements in Antarctic penguin chicks from South Shetland Islands, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, p. 67-75, 2013.

Jesus, T.B.; Carvalho, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, v. 12, p. 680-693, 2008.

Ji, Y. *et al.* Biochemical responses of freshwater fish *Carassius auratus* to polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides. **Water Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2012.

Jolliffe, I. T.; Cadima, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. **Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, 2016.

Jordão, C. P. *et al.* Distribution of heavy metals in environmental samples near smelters and mining areas in Brazil. **Environmental Technology**, v. 20, n. 5, p. 489-498, 1999.

Joshi, S.; *et al.* Scavenging action of zinc and green tea polyphenol on cisplatin and nickel induced nitric oxide generation and lipid peroxidation in rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 17, p. 402-409, 2004.

Kagi, J. H. R. **Overview of metallothionein** em: J.F. Riordan, B.L. Vallee (Eds.), **Methods of enzymology: Metallo Biochemistry: Metallothionein and related molecules**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 613–626.

Kehrig, H. A. *et al.* Mercury species, selenium, metallothioneins and glutathione in two dolphins from the southeastern Brazilian coast: Mercury detoxification and physiological differences in diving capacity. **Environmental Pollution**, v. 2013, p. 785-792, 2016.

Kehrig, H. A. *et al.* Mercury species, selenium, metallothioneins and glutathione in two dolphins from the southeastern Brazilian coast: Mercury detoxification and physiological differences in diving capacity. **Environmental Pollution**, v. 2013, p. 785-792, 2016.

Land, S. *et al.* Biliary and hepatic metallothionein, metals and trace elements in trace elements in environmentally exposed neotropical cichlids *Geophagus brasiliensis*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 347–355, 2018.

Lavandier, R. C. *et al.* PCB and PBDE contamination in Tursiops truncatus and Stenella frontalis, two data-deficient threatened dolphin species from the Brazilian coast. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 485-493, 2019.

Lavradas, R. T. *et al.* Investigation of thermostable metalloproteins in Perna perna mussels from differentially contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 34, p. 70-78, 2016.

Lavradas, R. T. *et al.* Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (Callinectes sp.) specimens from southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 55-60, 2014.

Leonard, S. S.; Harris, G. K.; Shi, X. L. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1921-1942, 2004.

Li, X. *et al.* Protective effects of selenium on mercury induced immunotoxic effects in mice by way of concurrent drinking water exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 104-114, 2014.

Lima, J. S. O biomonitoramento como ferramenta complementar na avaliação de impactos ambientais: Discutindo conceitos. EcoTerra Brasil. 2000.

Linde, A. R. *et al.* Metallothionein and heavy metals in brown trout (Salmo trutta) and European eel (Anguilla anguilla): A comparative study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 168-173, 1999.

Liu, X. Y. *et al.* A multivariate study of protective effects of Zn and Cu against nephrotoxicity induced by cadmium metallothionein in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 114, p. 239-245, 1992.

Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Amino Acids**, p. 26, 2012

Lusota, Maria Cecília Junqueira. **Industrialização, meio ambiente, inovação e competitividade** em: May, Peter H. **Economia do meio ambiente: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 205-220.

Macfarlane, G. R.; Schreider, M.; McLennan, B. Biomarkers of heavy metal contamination in the red fingered marsh crab, Parasesarma erythroactyla. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 4, p. 584-593, 2006.

Machado, R. C. *et al.* Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 217 – 275, 2017.

Markiewicz-Górka, I. *et al.* Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, p. 51-62, 2015.

Martins, P. A. P. **Determinação da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ por ICP-MS no sistema solo-vinho**. 2012. 32 p. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

Melo, G. J. Congresso brasileiro de geoquímica, IX, 2003, Belém. **Poluição química das águas**. Belém: 2003.

Mesquita, M. *et al.* Effects of zinc against mercury toxicity in female rats 12 and 48 hours after HgCl_2 exposure. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 15, p. 256-267, 2016.

Michalke, B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation - Part II: Recent trends in application. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 154-165, 2002.

Miwa, A. C. P.; Falco, P. B.; Calijuri, M. C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 236-242, 2008.

Monserrat, J. M. *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 221-234, 2007.

Montaser, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. 1ª Ed. USA: Wiley-VCH, 1998. 1004 p.

Morales, S.J.D. *et al.* Congresso de Ecologia do Brasil, VIII, 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil: Análise de elementos-traço em tecidos de odontocetos encalhados na costa de Sergipe e Bahia, Brasil**. Caxambu: 2007.

Mortatti, J.; Probst, J. L. **Hidrogeoquímica de bacias de drenagem**. Piracicaba: CENA/USP, 1998. 232 p.

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

De Moura, J.F. **O boto-cinza (*Sotalia guianensis*) como sentinela da saúde dos ambientes costeiros: estudo das concentrações de mercúrio no estuário Amazônico e costa norte do Rio de Janeiro**. 2009. 124 p. (Dissertação de Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2009.

Nicholson, S.; Lam, P. K. S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International**, v. 31, n. 1, p. 121-132, 2005.

Nogueira, S. **Investigação dos níveis de metais, proteínas e metaloproteínas em *Geophagus brasiliensis* como biomarcadores de contaminação ambiental de uma lagoa antropicamente impactada**. 2016. 56 f. (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-graduação Ciências Biológicas (Biodiversidade neotropical - PPGBio). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Nriagu, J. O.; Pacyna, J. M. Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soils by Trace-Metals. **Nature**, v. 333, n. 6169, p. 134-139, 1988.

Outridge, M.; Scheuhamer, M. Bioaccumulation and toxicology of nickel: implications for wild mammals and birds. **Environmental Reviews**, v. 1, p. 172-197, 1993.

Peterson, G. L. A. Simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

Pizarro, I. *et al.* Evaluation of arsenic species-protein binding in cardiovascular tissues by bidimensional chromatography with ICP-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectroscopy**, v. 19, p. 292-296, 2004.

Pontoporia blainvillei. IUCN Red List of Threatened species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/17978/0>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

Rafique, M.; Shaikh, S. P.; Tahir, F. Protective effect of zinc over lead toxicity on tests. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v.20, n.6, p.377-381, 2010.

Ramalho, J. F. G. P.; Sobrinhos, N. M. B. A.; Velloso, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, 2000.

Ramos, G.; Alves, A. L.; Hermes-Lima, M. **Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal** Em: El-Hani, C.N.; Videira, A.A.P. **O que é vida: para entender a biologia do século XXI**, 2000. p. 209-231.

Ribeiro, A. R.; *et al.* Toxic element concentrations in the razorbill Alca torda (Charadriiformes, Alcidae) in Portugal. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 588-595, 2009.

Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

Roesijadi, G.; Fellingham, G. W. Influence of Cu, Cd and Zn preexposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, p. 680-684, 1987.

Rogalska, J.; Pilat-Marcikiewicz, B.; Brozka, M. M. Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: A study in a rat model. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, p. 191-203, 2011.

Santos, M.A.V. *et al.* Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 157-160, 2005.

Sarkars, A. *et al.* Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340, 2006.

Sarsour, E. H. *et al.* Manganese superoxide dismutase regulates a metabolic switch during the mammalian cell cycle. **Cancer Research**, v. 72, n. 15, 2012.

SEBRAE/RJ, **Painel regional: Norte Fluminense/Observatório Sebrae/RJ**. Rio de Janeiro: SEBRAE/RJ, 2015.

SEBRAE/RJ, **Painel regional: Região dos Lagos/Observatório Sebrae/RJ**. Rio de Janeiro: SEBRAE/RJ, 2015.

Seixas, T. G. *et al.* Total mercury, organic and selenium in liver and kidney of South American coastal dolphin. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 98-106, 2008.

Settle, F. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 866 p.

Shaumlöffel, D. Precolumn isotope dilution analysis in nano HPLC-ICP-MS for absolute quantification of sulfur-containing peptides. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2859-2868, 2007.

Shrivastava, P.; Saxena, A.; Swarup, A. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (M. P.) India. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v.8, p. 1-4, 2003.

Siciliano, S.; Alves, V.C. e Hacon, S. Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: uma revisão do conhecimento brasileiro. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 13, p. 927-946, 2005.

Siciliano, S. et al. **Baleias, botos e golfinhos na Bacia de Campos**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

Siciliano, S.; FLACH, L. What is so funny about rough-toothed dolphins? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 5, 2007.

Singh, C. B.; Singh, S. P. Protective effects of Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, and Ni²⁺ on mercury and methylmercury toxicity to a cyanobacterium. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 23, p. 1-10, 1992.

Singh, P. K. *et al.* Complexation equilibria and evaluation of thermodynamic parameters of bivalent metal complex of glutathione. **Indian Journal of Chemistry**, v. 40A, p. 1339-1343, 2001.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5^a Ed. Philadelphia: Harcourt Brace College, 1998.

Souza, I. C. *et al.* Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161 p. 260-269, 2018.

Souza, T. S.; Fontanetti, C. S. **Ensaio do Cometa para Avaliação da Qualidade das Águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma Refinaria de Petróleo**. 4^a PDPETRO, Campinas, 2007.

Srikanth, K. *et al.* Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish e a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2133-2149, 2013.

Steno bredanensis. IUCN Red List of Threatened species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/20738/0>>. Acesso em 02 jan. 2018

Stewart, A. J. *et al.* Interdomain zinc site on human albumin. **PNAS**, v. 7, n. 100, p. 3701-3706, 2003.

Suedel, B. C.; *et al.* Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. **Reviews of Environmental Contamination and toxicology**, v. 136, p. 21-89, 1994.

Sun, L. *et al.* Historical characteristics of contamination and risk of heavy metals in Weishan Lake, China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.98, p.776-783, 2017.

Tanabe, S. Contaminations and toxic effects of persistent endocrine disruptors in marine mammals and birds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 69-77, 2002.

Tastet, L.; Shaumlöffel, D.; Lobinski, R. ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, p. 309-317, 2008.

Thomas, R. A beginner's guide to ICP-MS. **Spectroscopy Tutorial**. V.7, n. 17, 2002. Disponível em: <http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/beginer_guide_icpms.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2018.

Viarengo, A. *et al.* The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C. Toxicology and Pharmacology*, v. 146, n. 3, p. 281-300, 2007.

Vijayavel, K.; Balasubramanian, M. P. Changes in oxygen consumption and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab, *Scylla serrata*, exposed to naphthalene. **Chemosphere**, v. 63, p. 1523-1531, 2006.

Waalkes, M. P. *et al.* Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. **Toxicology Letters**, v. 20, n.1, p. 33-39. 1984.

Yabe, M. J. S.; Oliveira, E. O. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.

Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

Zhang, J. *et al.* Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater goldfish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 167-174, 2004.

Zhou, Z. *et al.* Preparation and coordination characterization of Glutathione-Zn²⁺ complex. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 964-968, 2012.