

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
ANIMAL

Fabiane Borba Bergmann

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ELEMENTOS-TRAÇO EM  
AVES AQUÁTICAS NÃO PASSERIFORMES EM ÁREAS ÚMIDAS**

Santa Maria, RS  
2016

**Fabiane Borba Bergmann**

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ELEMENTOS-TRAÇO EM AVES  
AQUÁTICAS NÃO PASSERIFORMES EM ÁREAS ÚMIDAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal.**

Orientador: Prof. Dr. Demétrio Luis Guadagnin  
Co-orientadora: Profa. Dra. Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Borba Bergmann, Fabiane  
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ELEMENTOS-TRAÇO EM AVES  
AQUÁTICAS NÃO PASSERIFORMES EM ÁREAS ÚMIDAS / Fabiane  
Borba Bergmann.- 2016.  
93 p. ; 30 cm

Orientador: Demétrio Luis Guadagnin  
Coorientadora: Vania Lucia Loro  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2016

1. Ecologia 2. Bioquímica 3. Toxicologia 4. Aves 5.  
Ambientes aquáticos I. Guadagnin, Demétrio Luis II.  
Loro, Vania Lucia III. Título.

**Fabiane Borba Bergmann**


**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ELEMENTOS-TRAÇO EM AVES  
AQUÁTICAS NÃO PASSERIFORMES EM ÁREAS ÚMIDAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas - Área Biodiversidade Animal**.

**Aprovado em 30 de maio de 2016:**



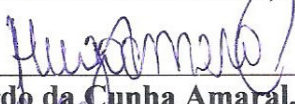
**Everton Rodolfo Behr, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



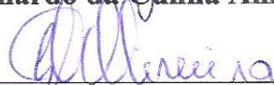
**Cecília Irene Pérez Calabuig, Dra. (UFERSA)**



**Charlene Cavalleiro de Menezes, Dra. (UFSM)**



**Hugo Leonardo da Cunha Amaral, Dr. (UFPel)**



**Guendalina Turcato Oliveira, Dra. (PUC-RS)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Carolo Bergmann e Nelcina Borba Bergmann,  
ao meu noivo, Hugo Amaral e às aves aquáticas,  
seres maravilhosos e encantadores.*

## AGRADECIMENTOS

Nestes quatro anos de doutorado, houve bons e maus momentos, mas graças ao apoio, auxílio e incentivo de diversas pessoas, instituições e órgãos hoje eu concluo mais esta etapa. Sendo assim, gostaria de fazer um agradecimento especial a todos.

Primeiramente agradeço aos meus pais, **Carolo e Nelcina**, que sempre me apoiaram e incentivaram as minhas decisões e logo aos meus irmãos, **Sérgio, Henrique e Eduardo**, juntamente com suas **famílias**. Agradeço também ao meu noivo e companheiro de todas as horas **Hugo Amaral** por todo auxílio em campo e na escrita, pela compreensão e pela troca de ideias.

As minhas queridas tias **Cleusa e Vicentina** pela hospedagem durante os quatro anos, carinho e compreensão.

Aos meus amigos e amigas por muitas vezes disponibilizarem um tempo para ouvir as alegrias e tristezas de uma doutoranda. Muitas sabem bem como é isto, como a **Tutti e a Mity**, algumas ainda saberão com a **Roberta** e daqui a um tempo talvez a **Rapha**.

A minha amiga **Anne** por de última hora me ajudar a resolver problemas com o famoso R.

A minha amiga **Nice** e a **profa. Cecília Calabuig** que participaram nos primeiros dois anos pessoalmente desta jornada. A elas, agradeço pelas conversas e ideias que sempre me proporcionam e amenizaram as incertezas.

A compreensão de todos os proprietários das lavouras de arroz que permitiram a coleta das aves e dos peixes. São eles: **Sr. João Volkmann, Paulo Duarte e Otávio Duarte**.

Ao presidente da Federação Gaúcha de Caça e Tiro **Sr. Carlos Rubem Schreiner** e ao diretor de percurso de caça **Sr. Ereovaldo Goldani** pela coleta das aves e pelo excelente profissionalismo com que foi tratado o meu estudo.

Ao meu orientador **prof. Demétrio Luis Guadagnin** pela oportunidade, troca de ideias, compreensão e paciência (mas bota paciência) em me atender, me ajudar e me ensinar (muitas vezes na sua própria casa) sempre que precisei. Agradeço também a sua esposa, a **profa. Eliana Wendland** por todo o auxílio e colaboração que me ofereceu.

A minha **co-orientadora profa. Vania Lucia Loro** pela colaboração do início ao fim, pela confiança depositada em mim e por me abrir as portas do Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTAQ). Agradeço também a todos os colegas do LABTAQ (**Charlene, Doti, Alines, Cíntia, Luciana, Maiara, Eduardo, Mauro, Tiago, Talise e Giane...**) que me receberam de braços abertos. Agradeço especialmente a colega e amiga **Doti**, pois sem os seus ensinamentos e sem a sua ajuda durante todo o processo de análises bioquímicas, as mesmas não teriam saído tão bem feitas.

Ao Laboratório de Análises de Resíduos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ao Museu de História Natural da Universidade Católica de Pelotas por permitir que eu realizasse as dissecações em suas dependências e em especial a amiga e **técnica bióloga Maria Helena** por me ensinar e me ajudar a realizar as 49 dissecações das aves e a fazer a preparação dos ossos, juntamente com sua colônia de Dermestes. Também agradeço ao técnico químico **Sr. Jair** por nos auxiliar nestes procedimentos.

Ao amigo e autodidata em aves **Paulo Roberto** por muitas vezes me acompanhar em campo e por vezes até participar das dissecações.

Aos meus colegas de doutorado **Matheus e Maycon**, pelas muitas caronas de idas e vindas e em especial ao **Matheus** que também participou do meu trabalho realizando a coleta de peixes nas lavouras de arroz.

Ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas, em especial ao **técnico biólogo Marco Antônio**, por me disponibilizar material biológico.

Ao **técnico biólogo Frank** que por vezes também me auxiliou a realizar algumas dissecações.

Ao **prof. Leandro Bugoni e a bióloga Suzana** do Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) por me auxiliarem nas dissecações do material biológico recebido do NURFS.

Ao **prof. Adalto Biachini** do Programa de Pós-Graduação e Fisiologia Animal Comparada da FURG e a professora **Marianna**, por me receberem e me proporcionarem total auxílio nas análises de metais nas penas das aves.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (secretaria, coordenação, professores e colegas) pela oportunidade, convívio, aprendizado, acolhimento e profissionalismo de todos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da minha bolsa de estudos.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBIO) pela concessão das autorizações para a coleta das aves e dos peixes.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt



## RESUMO

### BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ELEMENTOS-TRAÇO EM AVES AQUÁTICAS NÃO PASSERIFORMES EM ÁREAS ÚMIDAS

AUTORA: Fabiane Borba Bergmann  
ORIENTADOR: Demétrio Luis Guadagnin  
CO-ORIENTADORA: Vania Lucia Loro

Elementos-traço exercem influência nos ecossistemas aquáticos. Alguns, como cobre e zinco são essenciais aos organismos vivos em pequenas concentrações, mas podem se tornar tóxicos em altas concentrações. Outros, sem função biológica conhecida, como cádmio e chumbo são importantes contaminantes ambientais. O aumento de elementos-traço em ambientes aquáticos pode se tornar nocivo para as aves aquáticas, causando diversas alterações nestes organismos. Para o estudo destas relações, utilizamos duas abordagens, uma teórica e outra prática. Na primeira, realizamos uma revisão sistemática e uma metanálise sobre a associação entre a exposição às áreas contaminadas ao chumbo em aves aquáticas e os biomarcadores bioquímicos. Para isto foram feitas buscas de estudos nas bases de dados Web of Science, Scopus, Cab entre outras fontes. Biomarcadores como ácido delta-aminolevulínico desidratase, protoporfirina, hematócrito e hemoglobina tem demonstrado resultados satisfatórios de associação e de detecção de exposição ao chumbo. Já catalase, ceroloplasmina e glutathione redutase ainda são pouco explorados. Concluímos que há alterações bioquímicas em decorrência da exposição das aves às áreas contaminadas, mas que os biomarcadores podem ser influenciados por diversos fatores. Sugerimos a proposição de um protocolo de medição de alterações bioquímicas para estudos de campo e aconselhamos a utilização de vários biomarcadores para a detecção da exposição das aves à contaminação por chumbo. Na segunda abordagem, fizemos um estudo de campo e comparamos a concentração de elementos-traço e os níveis de biomarcadores em aves aquáticas que frequentam áreas de cultivo de arroz irrigado orgânicos e não orgânico. Testamos se: a) existem diferenças na exposição de aves aquáticas a elementos traço em sistemas de cultivo de arroz orgânico e não orgânico; b) existem diferenças entre as aves aquáticas que frequentam o sistema de cultivo de arroz orgânico e as que frequentam o sistema não orgânico quanto ao perfil dos biomarcadores de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, tióis não proteicos e proteína carbonil em fígado e músculo, e na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fígado; c) existe associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e a exposição aos elementos traço. Para isto realizamos coletas de aves aquáticas com arma de fogo em dois sistemas de cultivos de arroz irrigado. Separamos amostras de penas (para determinação das concentrações de elementos-traço), fígado e músculo (para a determinação dos perfis dos biomarcadores). Observamos maiores concentrações de cádmio e zinco nas penas das aves que utilizaram o sistema de lavouras orgânico e maiores concentrações de chumbo e cobre nas penas das que utilizaram o sistema de lavouras não orgânico. Observamos que substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, tióis não proteicos e proteína carbonil apresentaram maiores níveis no sistema de lavouras orgânicas e que superóxido dismutase e catalase apresentaram maiores atividades no sistema de lavouras não orgânico. Nesta abordagem concluímos que as aves aquáticas que frequentam lavouras de arroz apresentam diferenças quanto à exposição a elementos-traço e diferenças no seu perfil de biomarcadores. Entretanto, não verificamos uma associação consistente entre a exposição e os efeitos bioquímicos. Sugerindo que diversos fatores internos e externos não controlados possam afetar estas relações.

**Palavras-chave:** Anatidae. Contaminação. Exposição. Metais. Penas. Threskiornithidae.

## ABSTRACT

### BIOCHEMICAL BIOMARKERS AND TRACE ELEMENT IN WATER BIRDS NON-PASSERIFORMES IN WETLANDS

AUTHOR: Fabiane Borba Bergmann  
ADVISOR: Demétrio Luis Guadagnin  
CO-ADVISOR: Vania Lucia Loro

Trace elements exert influence on aquatic ecosystems. Some, such as copper and zinc are essential to living organisms in small concentrations, but they may become toxic at high concentrations. Others, with unknown biological function, such as cadmium and lead are important environmental contaminants. The increased of trace elements in aquatic environments can become harmful to water birds, causing several changes in these organisms. For the study of these relations, we used two approaches, one theoretical and one practical. In the first approach, we performed a systematic review and a meta-analysis on the association between the exposure to contaminated areas to lead in water birds and biochemical biomarkers. For this study, we searched databases such as Web of Science, Scopus Cab among other sources. Biomarkers like delta-aminolevulinic acid dehydratase, protoporphyrin, hematocrit and hemoglobin have been showing satisfactory results of association and detection of lead exposure. Whereas catalase, ceruloplasmin and glutathione reductase are still little explored. We concluded that there are biochemical changes due to the exposure of birds to contaminated areas, but the biomarkers may be affected by several factors. We suggest the proposition of a protocol to measure the biochemical changes to field studies and we advise the use of multiple biomarkers for the detection of the exposure of birds to lead contamination. In the second approach, we did a field study comparing the concentration of trace elements and biomarkers levels in water birds that are found at areas of organic and non-organic irrigated rice cultivation. We tested if: a) there are differences in water birds exposure to trace elements in organic and non-organic rice farming systems; b) there are differences between the aquatic birds that frequent areas of organic rice farming system and non-organic systems regarding the profile of biomarkers of oxidative stress: thiobarbituric acid reactive substances, non-proteic thiols and carbonyl protein in the liver and muscle, and in the activity of superoxide dismutase and catalase in the liver; c) there is an association between biomarkers of oxidative stress and the exposure to trace elements. For this study, we collected aquatic birds with a firearm in two irrigated rice systems. We separated feathers samples (to determine the concentrations of trace elements), liver and muscle (to determine the profile of biomarkers). We observed higher concentrations of cadmium and zinc in feathers of birds that were found at the organic farming systems and higher concentrations of lead and copper in feathers of those that were found at non-organic cultivation systems. We noticed that thiobarbituric acid reactive substances, non-protein thiols and carbonyl protein showed higher levels in organic cultivation system and superoxide dismutase and catalase showed higher activity in non-organic farming system. In this approach, conclude that the water birds that are found at rice fields presented differences on exposure to trace elements and differences on their biomarkers profile. However, we found no consistent association between the exposure and the biochemical effects. We suggest that various internal and external not controlled factors may affect these relations.

**Keywords:** Anatidae. Contamination. Exposition. Metals. Feathers. Threskiornithidae.

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1.3 PROPOSIÇÃO.....	23
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
<b>2 ARTIGO 1 - Lead poisoning in waterbirds: systematic review and meta-analysis</b>	<b>25</b>
<b>3 ARTIGO 2 – Biomarcadores de estresse oxidativo e contaminação por elementos-traço de aves aquáticas em diferentes sistemas de lavouras de arroz irrigado</b>	<b>66</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## **1 APRESENTAÇÃO**

Esta tese foi elaborada como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas - área de Biodiversidade Animal - do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria.

A tese é composta por um referencial teórico, proposição, material e métodos e dois artigos. No referencial teórico são apresentadas e explicadas as importâncias dos conceitos trabalhados no estudo, como cultura de arroz, aves aquáticas, contaminantes ambientais, radicais livres e estresse oxidativo, revisão sistemática e metanálise.

Os artigos estão apresentados de acordo com as normas das revistas que foram ou serão submetidos. No primeiro artigo foi realizada uma revisão sistemática e uma metanálise sobre a associação entre a exposição de aves aquáticas não passeriformes às áreas contaminadas ao chumbo e as consequentes alterações bioquímicas causadas nestas aves. No segundo artigo foi realizado um estudo sobre os efeitos dos contaminantes ambientais em aves aquáticas não passeriformes em diferentes sistemas de produção de arroz irrigado.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

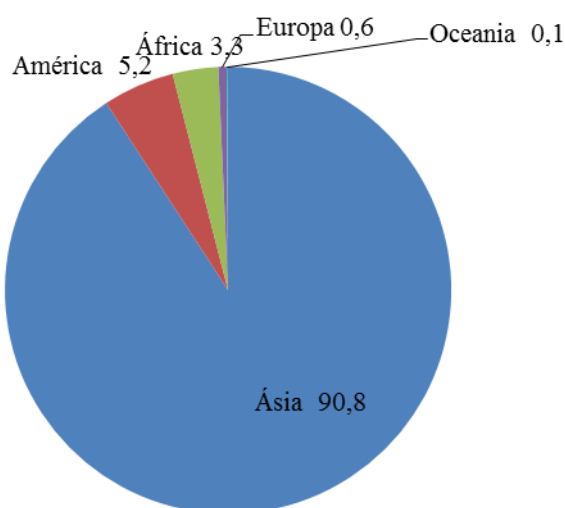
### 1.2.1 O CULTIVO DE ARROZ E SUA RELAÇÃO COM AS AVES AQUÁTICAS

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta que pertence à Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, tribo Oryzeae, família Poacea, subfamília Oryzoideae e ao gênero *Oryza* (SOUZA et al., 2008).

Já no ano de 2000 a cultura de arroz, orizicultura ou ainda rizicultura, ocupava 1,55 milhão de Km<sup>2</sup> de terras no mundo, o que equivalia a 11% de terras aráveis no mundo e mais de 1% da superfície terrestre (DONALD, 2004). A produção de arroz ocupa mais de 15% das áreas úmidas do mundo (LAWLER, 2001) e em diversos locais ela já é o único habitat duradouro para as aves aquáticas (FASOLA e RUÍZ, 1997; ELPHICK, 2000).

Em âmbito mundial são produzidas mais de 700 milhões de toneladas de arroz, com uma taxa de crescimento anual na produção de 2,29 milhões de toneladas. Para se ter uma ideia sozinho o continente asiático é responsável por mais de 90% desta produção (Figura 1), sendo a China, a Índia e a Indonésia os maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2015).

Figura 1 - Porcentagem de produção de arroz para cada continente do globo terrestre, com exceção da Antártida.



O arroz também é uma das principais culturas na América e neste continente a produção é maior que 36 milhões de toneladas; somente na América do Sul a produção gira em torno de 24 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015). Neste contexto, o Brasil é o país que

mais se destaca, produzindo mais de 11 milhões de toneladas de arroz e com uma taxa de crescimento anual de 4,53 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015).

No Brasil, esta produção está distribuída principalmente nos estados do Rio Grande do Sul (54% da produção nacional; maior produtor brasileiro), Santa Catarina (segundo maior produtor) e Mato Grosso. Todos estes estados produzem arroz a partir do sistema de cultivo irrigado, produzido em terras de várzeas. Já o arroz produzido em sistema de cultivo de sequeiro, produzido em terras altas, fica concentrado na região Norte (Pará e Tocantins), Nordeste (Maranhão e Piauí) e Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás) (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

Existem diversos tipos de sistemas de cultivo de arroz, por exemplo, plantio direto (PD) e cultivo mínimo (CM). Estes, na sua essência, consistem na sementeira de uma cultura diretamente sob uma cobertura dessecada ou sob os resíduos da cultura anterior, sem preparo mecânico do leito da sementeira. Com o avanço do sistema passou-se a acrescentar outras práticas agrícolas, como a rotação de culturas que promove a diversificação de espécies, cujo processo de sementeira ocorre com o mínimo de movimentação de solo e sob a resteva da cultura anterior, pastagem ou flora de sucessão, dessecadas com herbicida de ação total ou mecanicamente (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

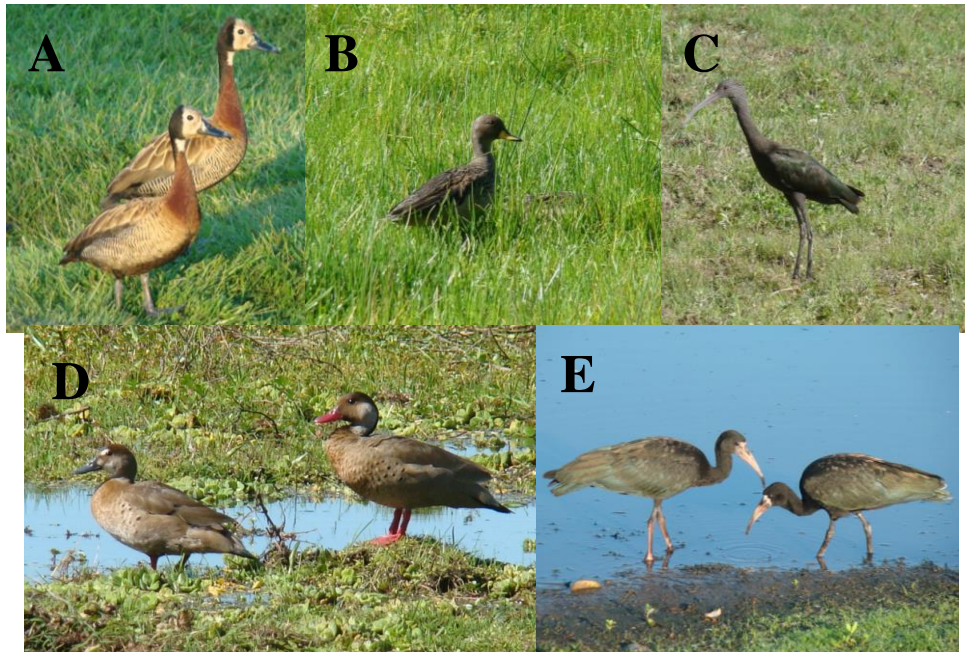
O sistema convencional ou tradicional é o mais utilizado na região sul do Brasil. Consiste em preparos do solo, sementeira do arroz a lanço ou em linha e o estabelecimento de lamina de água sobre o solo de 20 a 35 dias após a emergência das plântulas (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

Além destes, pode-se citar o sistema de cultivo de arroz pré-germinado e transplante de mudas. O primeiro é caracterizado por um conjunto de técnicas de cultivo de arroz em áreas sistematizadas (quadros fixos, regulares e de pequenas dimensões, separados por taipas permanentes) onde as sementes, previamente germinadas, são lançadas em quadros nivelados e inundados. O segundo é um sistema de sementeira indireta, onde inicialmente as plantas crescem em um viveiro de mudas e posteriormente são plantadas em um local definitivo (permite a produção de sementes geneticamente puras) (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

A cultura de arroz irrigado vem substituindo ambientes aquáticos naturais ao longo do tempo, tornando-se banhados artificiais que propiciam, temporariamente, uma ampliação do habitat de diversas espécies da fauna, principalmente de aves aquáticas (Figura 2). No entanto, esta relação pode se tornar negativa e por isto a necessidade de estudos nestes

agroecossistemas e da redução do uso de pesticidas (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e fertilizantes (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

Figura. 2 - Exemplos de espécies de aves aquáticas. A) Dois indivíduos *Dendrocygna viduata*. B) *Anas flavirostris*. C) *Plegadis chihi*. D) Casal de *Amazonetta brasiliensis*. E) *Phimosus infuscatus*.



Para as aves aquáticas, a orizicultura propicia alimentação abundante, composta por variadas dietas, tais como, seus próprios e outros grãos, macrófitas aquáticas, invertebrados e vertebrados aquáticos (STAFFORD et al., 2010). Também proporciona locais para a reprodução para diversas famílias de aves aquáticas, por exemplo, Anatidae, Ardeidae, Rallidae, Gruidae, Charadriidae, Recurvirostridae, Scolopacidae, Laridae, Sternidae e muitas espécies de Passeriformes, como *Chrysomus ruficapillus* (Vieillot, 1819) (PIERLUISSI, 2010). Além do mais, serve de local de descanso durante a migração de aves migratórias, como *Pluvialis dominica* (Statius Muller, 1776) (DIAS e BURGER, 2005; ELPHICK, 2010).

## 1.2.2 CONTAMINANTES AMBIENTAIS

### 1.2.2.1 Agrotóxicos e fertilizantes

Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Ou ainda substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos agem interferindo nos processos bioquímicos e/ou fisiológicos que podem ser comuns para um grande número de doenças e organismos não alvo (COLIN e CANN, 2011). Isto pode provocar mudanças negativas na qualidade ambiental e seus impactos podem se refletir em diversos organismos, por exemplo, alimentos de origem vegetal (PASSOS e REIS, 2013), águas superficiais e subterrâneas (SANCHES et al., 2003), solo, animais e humanos (AKTAR et al., 2009; RATNER, 2009; COLIN e CANN, 2011; KLAASSEN e WATKINS, 2012). Além disto, agrotóxicos utilizados por curto período de tempo representam menor ameaça; ao contrário dos utilizados por longos períodos (WRIGHT e WELBOURN, 2002; COLIN e CANN, 2011). A avaliação da consequência do uso dos agrotóxicos se faz em função da sua natureza (toxicidade e propriedades), do organismo e da exposição (quantidade, frequência e duração) (PIERZYNSKI, 1994).

Já os fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes são insumos básicos que, empregados de forma correta, aumentam a produção agrícola (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015). Os mais utilizados em lavouras de arroz irrigado são os fertilizantes nitrogenados e fosforados (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005). Estes também podem causar danos na qualidade ambiental se utilizados de forma inadequada. Por exemplo, o nitrato pode poluir tanto as águas superficiais como as subterrâneas. As águas superficiais podem sofrer eutrofização, já as subterrâneas podem ser contaminadas e prejudicar o seu consumo. Enquanto que o fósforo pode limitar o crescimento de algas e plantas e em excesso também pode provocar a eutrofização (ESTEVEES, 2011).

Incluídos no grupo dos agrotóxicos os fungicidas são substâncias químicas, de origem natural ou sintética que, aplicadas às plantas, protegem-nas da penetração e/ou do posterior desenvolvimento de fungos patogênicos em seus tecidos (REIS e BRESOLIN, 2007). No



entanto, alguns agrotóxicos inorgânicos podem ser à base de elementos-traço, tais como cobre, chumbo e zinco (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

### **1.2.2.2 Elementos-traço**

Os elementos-traço são elementos químicos que ocorrem na natureza em pequenas concentrações (até 0,1%). Assim este termo tem relação com a sua abundância e inclui elementos de diferentes propriedades químicas (ESTEVES, 2011). São elementos extremamente importantes para os ecossistemas aquáticos, por exemplo, cobre (Cu) e zinco (Zn) que são essenciais aos organismos vivos em pequenas concentrações. Porém, muitos se tornam tóxicos em altas concentrações, tais como cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (ambos sem função biológica conhecida) e outros, como o mercúrio (Hg), podem até mesmo bioacumular e biomagnificar na cadeia trófica e apresentar riscos aos animais predadores de topo, incluindo os humanos (HEATH, 1995; RODGHER et al., 2005; ANDREANI et al., 2008). Em altas concentrações no ambiente, Pb e Cd causam efeitos adversos no sistema fisiológico, principalmente no endócrino (MARTIN et al., 2003). Além de causar efeitos maléficos na reprodução e saúde geral das aves aquáticas (DAUWE et al., 2002).

As fontes naturais de Cd são: rochas sedimentares, solos, emissões vulcânicas e queima de florestas. Também são fontes os fertilizantes manufaturados usados nos solos da agricultura à base de Cd rico em fosfato, esgotos industriais e domésticos, fundição de metais de base e refino (primariamente Pb-Zn), combustão de combustíveis fósseis, disposição de resíduos sólidos, lamas de depuração para solos agrícolas (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

O Cd é usado em inúmeras aplicações, por exemplo, baterias de Ni-Cd, revestimento, pigmentos, plásticos estabilizadores e ligas. Além disto, mas mais raramente, pode ser usado como fungicida (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

Este metal não tem função biológica conhecida e sua toxicidade tem sido bem demonstrada em plantas e em animais, tanto em ambientes aquáticos, quanto terrestre (DAS et al., 1997; NORDIC COUNCIL OF MINISTERS, 2003). A biodisponibilidade de Cd no ambiente é aumentada sobre condições de pH baixo, portanto a acidificação dos meios contribui para a mobilidade e disponibilidade de Cd tanto para o ambiente aquático quanto para o terrestre. Mesmo que o elemento tenda a bioacumular nos organismos, não há evidências que ele biomagnifique (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

Contudo, o Cd possui propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas para a vida silvestre e com menos de 10 ppb já pode produzir efeitos adversos na mesma. Alguns

efeitos na vida aquática são: mortalidade, redução na taxa de crescimento e redução e inibição na reprodução (EISLER, 1985). A concentração de 40mg/kg (40lg/g) de Cd em tecido de fígado de aves deve ser considerada limiar de intoxicação, considerando que existe variação entre as espécies (FURNESS, 1996).

O Pb é um dos metais mais utilizados no mundo; há tempos principalmente em encanamentos e na atualidade é muito utilizado no tetraetilchumbo, um aditivo para a gasolina. As maiores formas de mobilização de Pb são o intemperismo, as emissões vulcânicas e também é liberado no meio ambiente através da fundição de minérios de Pb e seus resíduos. Desta forma, torna-se presente no ambiente e expõe os diversos tipos de organismos que nele vivem. A ingestão de chumbada de pesca por peixes e de partículas de Pb por aves aquáticas (derivadas de projéteis de armas de fogo utilizadas para a caça) é um exemplo das mais altas exposições deste metal na biota não humana (PAIN, 1996). Além disto, os sistemas aquáticos estão expostos ao Pb através de efluentes industriais, derramamentos de petróleo e derivados, o que acaba por acidificar estes sistemas, prejudicando a vida aquática. Pode haver transferência para a cadeia trófica, mas não ocorre a biomagnificação (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

A quantificação de Pb no fígado de aves expostas ao mesmo é rotineiramente utilizada para determinar o quanto o animal esta intoxicado. Por exemplo, um fígado de uma ave com mais que 10 ppm ww pode ser associado com sinais de intoxicação, mas os sinais já podem ocorrer antes mesmo desta concentração (LEJEUNE et al., 2000).

As concentrações de Pb no fígado são classificadas nas seguintes categorias: sem efeito, efeitos fisiológicos (diminuição do ácido delta amino-levulínico/ALAD sem sinais evidentes de intoxicação), efeitos tóxicos (sinais evidentes de intoxicação como perda de massa muscular, fraqueza, anemia e falta de coordenação nos movimentos) e ainda efeitos tóxicos severos (mortalidade e morbidade) (LEJEUNE et al., 2000; NAM e LEE, 2006).

Dependendo da quantidade de Pb que foi ingerido por uma ave aquática a intoxicação pode ser aguda (podendo levar à morte em até 10 dias) ou crônica (levando à morte de forma mais lenta). As aves expostas à intoxicação crônica ficam com o sangue, o sistema nervoso e os músculos afetados e isto faz com que o animal se torne suscetível a predação, sofra de inanição e doenças, o que aumenta as suas chances de morte (PAIN, 1995; SCHEUHAMMER e NORRIS, 1996).

O Cu é um elemento abundante no meio ambiente e essencial para o crescimento e metabolismo de todos os organismos (WHO, 1996). É encontrado em minas e após sua extração tem sido utilizado na sua forma pura ou em ligações (Cu-lata, Cu-Zn) e desta forma

ele passa a ser usado, por exemplo, na fabricação de ferramentas, ornamentos, estátuas, joias, moedas, embarcações, fiação elétrica, canalização e galvanoplastia. Além do mais, sais de Cu são usados como fungicidas, moluscicidas e algicidas e a partir daí, através da agricultura, ele pode se depositar no ambiente (aquático ou terrestre). Além de se depositar no ambiente pelo depósito de lixo e de esgotos industriais. Destas formas, ele pode se tornar uma via de exposição para plantas e animais, em que os organismos mais suscetíveis aos efeitos negativos do Cu são os aquáticos (EISLER, 1998; WRIGHT e WELBOURN, 2002; KAMUNDE e WOOD, 2004). O Cu não biomagnifica na cadeia trófica, porém existem evidências de que em altas concentrações ele pode ser carcinogênico, mutagênico e teratogênico (ELSIER, 1998).

O Zn é encontrado em rochas calcárias, combinado ao enxofre (S) e ao oxigênio (O<sub>2</sub>), sob a forma de sulfeto de óxido, associado ao Pb, ao Cu, a prata (Ag) e ao ferro (Fe) (MEDEIROS, 2012). Sua forma de entrada no ambiente é através do intemperismo físico ou químico (SANTOS, 2005, BROADLEY et al., 2007).

É utilizado principalmente na indústria de galvanização, protegendo peças de aço e ferro (Fe) da corrosão, ligas metálicas, terminais elétricos, confecção de joias ou bijuterias, pilhas, baterias. Também é utilizado na indústria química para a produção de fertilizantes, tintas, plásticos e borrachas. Além de ser utilizado na indústria cosmética e farmacêutica, como por exemplo, na fabricação de pós, bases faciais e complexos vitamínicos (MOORE e RAMAMOORTHY, 1984; LESTER, 1987; MEDEIROS, 2012).

Biologicamente, o Zn é um dos elementos-traço essenciais mais importantes que existem, pois é um componente estrutural das proteínas, sendo necessário para basicamente todas as formas de vida (BRYCE-SMITH, 1989; MEDEIROS, 2012). Os níveis deste metal são naturalmente mais altos nos organismos vivos e são regulados metabolicamente. Assim, ele é importante em muitos processos metabólicos, especialmente na ativação de enzimas e na regulação da expressão dos genes (SAVINOV et al., 2003).

Porém em grandes quantidades pode-se tornar tóxico (HEATH, 1995). As principais fontes poluidoras de Zn são os efluentes industriais, as atividades de mineração, o uso de lodos de esgoto e materiais compostados na agricultura, bem como o uso de agrotóxicos (KIEKENS, 1990; AGUIAR et al., 2002).

Diante de elementos-traço é importante distinguir conceitos de bioacumulação e biomagnificação. Bioacumulação é o processo pelo qual substâncias (ou compostos químicos) são absorvidas pelos organismos. Este processo pode ocorrer de forma direta, quando as substâncias são assimiladas através do meio ambiente (solo, sedimento, água) ou indireta

quando as mesmas são ingeridas pelos organismos. Geralmente, esses processos ocorrem de forma simultânea, principalmente em ambientes aquáticos. Já biomagnificação é o processo que ocorre quando há acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro ao longo da teia trófica. Assim, predadores de topo têm maiores concentrações dessas substâncias em seu organismo do que suas presas. O primeiro ocorre em nível de organismo e o segundo em nível de teia trófica (REPETTO e SANZ, 1995).

### 1.2.3 OS ELEMENTOS TRAÇO E A SUA RELAÇÃO COM AS AVES AQUÁTICAS

Aves aquáticas são consideradas todas as espécies de aves dependentes ecologicamente de ambientes úmidos, ou seja, que dependem destas áreas para o seu desenvolvimento, reprodução e sobrevivência em alguma fase da sua vida. Alguns exemplos de famílias de aves aquáticas são: Anatidae, Ardeidae, Ciconiidae, Rallidae e Threskiornithidae (WETLANDS INTERNATIONAL, 2012; GILL e DONSKER, 2016).

Desta forma, o aumento de elementos-traço nestes ambientes pode se tornar nocivo e tóxico aos organismos que nele vivem inclusive as aves aquáticas, causando diversas alterações nestes organismos, como: bioquímicas, fisiológicas, histológicas e morfológicas (ESTEVES, 2011).

Em um estudo realizado em ambientes aquáticos da Itália, com *Phoenicopterus ruber* (Linnaeus, 1758) (Phoenicopteriformes: Phoenicopteridae) foram analisadas as concentrações de Pb (oriundo de projéteis de armas de fogo), Cd e Hg em fígado, rins, ossos e penas, além de moela. Foram encontradas altas concentrações de Pb em fígado e rins (média de 313,2 e 157,3 mg/g dw respectivamente) (ANCORA et al., 2008).

Outro estudo, no sudoeste da Espanha, Aznalcóllar, se propôs a avaliar as concentrações de Pb, Zn, Cu, Cd e arsênio (As) e a resposta ao estresse de hormônios da tireoide e corticosterona no sangue de *Ciconia ciconia* (Linnaeus, 1758) (Ciconiiformes: Ciconiidae). Foi revelado que o Pb pode interferir no sistema de respostas da corticosterona, o que afeta as condições físicas das aves aquáticas e por fim na sua sobrevivência (BAOS et al., 2006). No sudeste da Polônia, próximo a Zator, foram medidas as concentrações de Cd, Cu e Zn da água e de cérebro, músculo, coração, rins e fígado de *Anas platyrhynchos* (Linnaeus, 1758) (Anseriformes: Anatidae) e *Fulica atra* (Linnaeus, 1758) (Gruiformes: Rallidae). De uma forma geral, as amostras dos tecidos das aves e das águas foram consideradas com altos níveis de Cd e normais para Cu e Zn, visto que estes dois são elementos essenciais para funcionamento fisiológico correto dos organismos (BINKOWSKI et al., 2013).

Em Kleberg e Nueces, no Texas, foram verificadas as concentrações de As, Cd, Cu, Pb e selênio (Se) nos fígados de *Anas discors* (Linnaeus, 1766) (Anseriformes: Anatidae). A máxima concentração de Cd foi  $>10$  lg/g, de Cu foi de 227,3 lg/g e os valores de Pb foram incertos (FEDYNICH et al., 2007). Em Gyeonggi-do, na Coreia do Sul, um estudo com *Ardea cinerea* (Linnaeus, 1758) *Egretta garzetta* (Linnaeus, 1766) e *Nycticorax nycticorax* (Linnaeus, 1758) (Pelecaniformes: Ardeidae) quantificou a concentração de Pb e Cd em penas e conteúdo estomacal. Para as penas foi detectada uma média de 1,72, 2,53 e 2,24  $\mu\text{g/g dw}$  para Pb e de 0,48, 0,75 e 0,88  $\mu\text{g/g dw}$  para Cd para *A. cinerea*, *E. garzetta* e *N. nycticorax*, respectivamente. Para os conteúdos estomacais foi detectada uma média de 3,89, 5,21 e 13,2  $\mu\text{g/g dw}$  para Pb e de 0,44, 0,66 e 1,38  $\mu\text{g/g dw}$  de Cd para *A. cinerea*, *E. garzetta* e *N. nycticorax*, respectivamente (KIM e OH, 2014).

No lago Erie e no lago Sant Clair, no Canadá, foram realizadas as medidas das concentrações de metais e metalóides (alumínio (Al), As, cálcio (Ca), Cd, cobalto (Co), cromo (Cr), Cu, Fe, potássio (K), magnésio (Mg), sódio (Na), níquel (Ni), Pb, vanádio (V) e Zn) em fígado de *Cygnus olor* (Gmelin, 1789) (Anseriformes: Anatidae). As médias das concentrações para fêmeas de Erie e Sant Clair para Cd foram 1,77 e 1,09  $\mu\text{g/g dw}$ , para Cu 1588 e 944  $\mu\text{g/g dw}$ , para Pb 1 e 0,59  $\mu\text{g/g dw}$  e para Zn 166 e 110  $\mu\text{g/g dw}$  e as médias das concentrações para machos de Erie e Sant Clair para Cd foram 1,36 e 1,88  $\mu\text{g/g dw}$ , para Cu 2441 e 2368  $\mu\text{g/g dw}$ , para Pb 0,57 e 0,63  $\mu\text{g/g dw}$  e para Zn 110 e 117  $\mu\text{g/g dw}$ . Neste trabalho as concentrações de Cu foram consideradas altas e potencialmente comprometedoras da saúde e da reprodução destas aves (SHUMMER et al., 2011). Em New Jersey Meadowlands, Estados Unidos, um estudo analisou Pb, Hg, Cd, Cr e As em ovos, penas e tecidos (fígado e músculo) de *Branta canadensis* (Linnaeus, 1758) (Anseriformes: Anatidae). Para fígado as médias de Cd e Pb foram 1,99 e 249 ng/g ww, para músculo as médias de Cd e Pb foram 5,70 e 14,4 ng/g ww e para penas as médias de Cd e Pb foram 85,6 e 1910 ng/g ww (TSIPOURA et al., 2011).

#### 1.2.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons (partículas com carga negativa que giram ao redor do núcleo do átomo) não pareados em sua órbita (GOODYEAR-BRUCH e PIERCE, 2002). Praticamente todos os elétrons de um organismo vivo são pareados e tanto os átomos quanto as moléculas com elétrons pareados são estáveis. Quando existir apenas um elétron na órbita ou o elétron tornar-se não pareado, o

átomo ou a molécula torna-se instável e assim, são chamados de radicais livres (PIERCE et al., 2004).

Na tentativa de se estabilizarem, os radicais livres “roubam” elétrons de ácidos nucleicos, lipídios, ou moléculas próximas através de um processo denominado de redução. A molécula que capta um elétron é reduzida ou estabilizada e a que perde é oxidada; a perda de um elétron é o que gera os radicais livres. Se o sistema de defesa do organismo não reage a estes radicais livres, eles geram uma reação em cadeia que pode resultar em danos celulares e doenças (PIERCE et al., 2004).

Existem dois principais tipos de radicais livres: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os organismos vivos sofrem constantemente a ação destas espécies, as quais são geradas a partir de processos inflamatórios, disfunções biológicas ou provenientes do tipo de dieta do animal. As principais ERO dividem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\bullet$ ); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já nas ERN estão inclusos o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (WISEMAN et al., 1995; HALLIWELL, 1999; CADET et al., 1999; CHATGILIALOGLU e O'NEILL, 2001). Alguns destes radicais, como o  $\text{HO}\bullet$ , podem ser altamente reativos no organismo, podendo atacar lipídios, proteínas e DNA (BARREIROS e DAVID, 2006).

O sistema de defesa natural dos organismos contra os radicais livres são os antioxidantes que são substâncias inibidoras de oxidação e de radicais livres. Os antioxidantes inibem, limitam e reparam as lesões celulares causadas por ERO (PIERCE et al., 2004). Quando a geração de radicais livres e a de antioxidantes está equilibrada não ocorre dano celular, este equilíbrio chama-se redução-oxidação ou redox (GOODYEAR-BRUCH e PIERCE, 2002). Quando ocorre um desequilíbrio, ou seja, há mais radicais livres do que antioxidantes para controlá-los, ocorre o estresse oxidativo (GOODYEAR-BRUCH e PIERCE, 2002).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático (BARBOSA et al., 2010). O sistema enzimático é composto de quatro principais enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR), as quais convertem ERO em  $\text{H}_2\text{O}$  para prevenir a super produção de radicais livres (PIERCE et al. 2004). Superóxido dismutase é uma enzima que converte  $\text{O}_2\bullet^-$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CAT converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , GPx e GR convertem  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BARREIROS e DAVID, 2006).

O sistema não-enzimático inclui os compostos antioxidantes de origem alimentar, onde se destacam: vitaminas (ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, respectivamente os precursores das vitaminas E, A e C) minerais e compostos fenólicos. Também são antioxidantes outros carotenóides, como licopeno, luteína e zeaxantina e dentre os minerais destacam-se: Zn, Cu, Se e Mg (PRASAD et al., 2007; VICENT et al., 2007).

### 1.2.5 BIOMARCADORES

Existem formas diferentes de se determinar as concentrações de elementos-traço nos organismos. Uma delas é a direta, onde se determina as concentrações diretamente no tecido animal utilizando, por exemplo: penas, excretas e sangue (detecção de intoxicação a curto prazo; RATTNER et al., 2008), fígado, rins e músculo (detecção de intoxicação a médio prazo) ou osso (intoxicação de longo prazo) (ANCORA et al., 2008).

Contudo, todas as alterações que podem ocorrer nos animais dependem também de outros fatores, tais como: espécie, sexo, idade, tipo de alimentação, sazonalidade, espaço, tecidos e órgãos (FEDYNICH et al., 2007; CID et al., 2009; KIM et al., 2010; TSIPOURA et al., 2011; KIM e OH, 2014).

Outra forma de detectar as alterações que os elementos-traço causam nos organismos é através de biomarcadores, os quais são definidos como mudanças na resposta biológica, desde celulares e fisiológicas até comportamentais. Estas respostas podem ser relatadas pela exposição ou o efeito tóxico dos contaminantes ambientais e medidas no organismo ou em seus produtos (PEAKALL, 1994; VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996). Biomarcadores são utilizados de forma ampla para refletir a interação entre o sistema biológico e um perigo potencial, seja ele químico, físico ou biológico (WHO, 1993).

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes (COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987; WHO, 1993):

- Biomarcadores de exposição: Detectam e medem a quantidade de uma substância exógena, seus metabólitos ou o produto da interação entre um agente xenobiótico e moléculas ou células alvo no organismo;
- Biomarcadores de efeito: Incluem medidas bioquímicas, alterações fisiológicas ou outras alterações nos tecidos e fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidos e associados com uma doença ou prejuízo a saúde do organismo;

- Biomarcadores de suscetibilidade: Indicam a habilidade adquirida ou inerente de um organismo responder a exposição a um xenobiótico específico. Estas respostas incluem fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a sensibilidade de um organismo a uma dada exposição.

Dentre os biomarcadores de efeito destacam-se os antioxidantes enzimáticos: CAT, SOD, GPx e GR, produtos derivados da oxidação de lipídeos: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dosadas a partir do malondialdeído (MDA) (DRÖGE, 2002); defesas antioxidantes não enzimáticas como, tióis não proteicos (NPSH) (TREVISAN, 2008) e proteína carbonil (PC) (indicador mais utilizado para detecção de oxidação proteica) (DALLE-DONNE et al., 2003).

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica que pode ser medido utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA); é considerado um biomarcador geral de dano oxidativo (VASCONCELOS et al. 2007). Uma classe de compostos orgânicos de S é conhecida como sulfídrilas ou tióis que podem ter massa molecular (tióis proteicos; PSH) ou não ter massa molecular (tióis não proteicos; NPSH). Os NPSH são representados principalmente pela glutatona (GSH), a qual é o principal grupo sulfídrico não proteico encontrado nas células animais (LU, 2009). O conteúdo carbonílico de proteínas é utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo. Contudo é necessário identificar a natureza do grupo carbonílico (VASCONCELOS et al. 2007).

Outro biomarcador de efeito que se destaca para a análise de contaminantes ambientais em aves aquáticas é a ceruloplasmina (CP), a qual faz parte do sistema antioxidante não enzimático e é uma proteína de transporte de metais de transição que, especificamente, transporta o Cu e oxida o Fe para ser captado pela transferrina (proteína que transporta o Fe) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

A enzima ácido delta amino-levulínico desidratase (ALAD) e a proteína protoporfirina que atuam na biossíntese do grupo heme também servem como biomarcadores de contaminantes ambientais (KLAASSEN e WATKINS, 2012). O Pb, por exemplo, pode causar uma diminuição na biossíntese do grupo heme por inibição de enzimas que catalizam a sua formação, incluindo ALAD, que é sensível, específica e um biomarcador bem estabelecido de exposição ao Pb (KELADA et al., 2001; PATTE e PAIN, 2003). Com a diminuição das enzimas que catalizam a biossíntese do grupo heme, ocorre um acúmulo de protoporfirina no organismo, a qual também pode ser utilizada como biomarcador de exposição ao Pb (DAL MOLIN et al., 2006). Devido à diminuição da biossíntese do grupo



heme, conseqüentemente hemoglobina e hematócrito também são afetados e podem ser utilizados como biomarcadores (BITTO et al., 2006).

E ainda, bioindicadores são definidos como organismos que fornecem informações sobre as condições ambientais de seu habitat por sua presença ou ausência, ou ainda por seu comportamento; e indicadores ecológicos são parâmetros do ecossistema que descrevem a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas (PEAKALL, 1994; VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996).

### 1.2.6 REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

A revisão sistemática, diferentemente da revisão de literatura, é uma revisão planejada para responder a uma questão específica e que utiliza métodos explícitos e sistemáticos para identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos e para coletar e analisar os dados referentes a estes estudos. A revisão sistemática exige alguns requisitos (BORENSTEIN et al., 2009; CENTRE FOR EVIDENCE-BASED CONSERVATION, 2016). São eles: uma questão de pesquisa objetiva, uma extensa pesquisa de literatura que inclua até mesmo importantes pesquisas não publicadas, critérios de inclusão e exclusão de estudos, uma síntese dos dados quantitativos, sempre que possível, e uma interpretação dos resultados (BORENSTEIN et al., 2009; CENTRE FOR EVIDENCE-BASED CONSERVATION, 2016).

Já a metanálise é o método estatístico utilizado na revisão sistemática que resume os resultados de pelo menos dois diferentes estudos. As vantagens de uma metanálise são aumentar o poder estatístico e melhorar a sua precisão, além de aumentar a capacidade de lidar com um número maior de estudos do que simplesmente fazer combinações primárias (HIGGINS e GREEN, 2011).

A metanálise foi desenvolvida e aplicada primeiramente na psicologia (GLASS, 1976) e na medicina (BORENSTEIN et al., 2009) e a partir de 1990 na ecologia e na biologia da conservação (ARNQVIST e WOOSTER, 1995; COTÊ et al., 2005; WINFREE et al., 2009; VETTER et al., 2013) com fundamentos do Centro para Evidências Baseadas em Conservação, tomando como exemplo o Cochrane Collaboration, rede de especialistas dedicada em fornecer pesquisas de evidências de alta qualidade na área da saúde (THE COCHRANE COLLABORATION, 2016; CENTRE FOR EVIDENCE-BASED CONSERVATION, 2016).

### 1.3 PROPOSIÇÃO

Apresentados todos os conceitos acima e explicadas todas as suas importâncias, a proposta deste estudo foi verificar se contaminantes ambientais, tal como elementos-traço, causam alterações bioquímicas (p.e. estresse oxidativo) em aves aquáticas não passeriformes.

Sendo que os objetivos específicos foram:

- 1- Realizar uma revisão sistemática e uma metanálise sobre a associação entre a exposição de aves aquáticas não passeriformes às áreas contaminadas ao chumbo e as alterações bioquímicas causadas nestas aves;
- 2- Determinar se existem diferenças na exposição de aves aquáticas a elementos-traço em sistemas de cultivo de arroz irrigado orgânico e não orgânico;
- 3- Avaliar se existem diferenças entre as aves aquáticas que frequentam o sistema de cultivo de arroz orgânico e as que frequentam o sistema não orgânico quanto ao perfil dos biomarcadores de estresse oxidativo;
- 4- Verificar se existe associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e a exposição aos elementos-traço.

## 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste estudo, dividimos-o em duas abordagens, uma teórica e outra prática. Na primeira abordagem, realizamos uma revisão sistemática e uma metanálise sobre a associação entre a exposição às áreas contaminadas ao Pb em aves aquáticas e os biomarcadores bioquímicos. Para isto foram feitas buscas de estudos nas bases de dados Web of Science, Scopus, Cab entre outras fontes. Os critérios de busca foram: estudos observacionais que tivessem aves aquáticas como espécies alvo; aves aquáticas de vida livre, sendo que foram excluídas da busca espécies de aves aquáticas passeriformes. Avaliamos medidas que podem ser afetadas pela exposição ao Pb, tais como: Acetilcolinesterase (AChE), ácido delta amino-levulínico (ALAD) enzimas antioxidantes, butirilcolinesterase, (BChE), catalase (CAT), ceruloplasmina (CP), cortisol, glicose, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GSH), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GSR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), hemoglobina, hematócrito, lactato, metalotioneína, tióis não proteicos (NPSH), oxidativo, espécies reativas ao oxigênio (ROS), proteína carbonil (PC), superóxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) protoporfirina.

Na segunda abordagem, fizemos um estudo de campo e comparamos a concentração de elementos-traço e os perfis de biomarcadores em aves aquáticas que frequentam áreas de cultivo de arroz irrigado orgânico e não orgânico. Para isto realizamos coletas de aves aquáticas com arma de fogo em dois sistemas de cultivos de arroz irrigado: sistema de cultivo de arroz irrigado orgânico e sistema não orgânico, respectivamente nos municípios de Sentinela do Sul e Tapes. Após a coleta, separamos amostras de penas (para determinação das concentrações de elementos-traço), fígado e músculo (para a determinação dos perfis dos biomarcadores) no Museu de História Natural da Universidade Católica de Pelotas. As amostras de penas foram encaminhadas para análise de elementos-traço na Universidade Federal do Rio Grande, enquanto que as amostras de fígado e músculo foram encaminhadas para análise no Laboratório de Toxicologia Aquática da Universidade Federal de Santa Maria.

## 2 ARTIGO 1

Artigo submetido para a revista Aquatic Toxicology

### Lead poisoning in waterbirds: systematic review and meta-analysis

Fabiane Borba Bergmann<sup>a\*</sup>, Matheus Fragoso Etges<sup>b</sup>, Vania Lucia Loro<sup>a</sup>, Eliana Marcia Da Ros Wendland<sup>c</sup>, Demétrio Luis Guadagnin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Cidade Universitária, Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Setor 4, Prédio 43411, Sala 218, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author. E-mail address: fabiberg@yahoo.com.br (Bergmann. F.B.).

#### ABSTRACT

Lead is a trace element which can contaminate waterbirds in several ways (air, sediment /soil and food), but in nature this contamination is difficult to identify. Because of this, methods are being studied that combine the concentration of lead with biochemical changes. Thus, a systematic review and a meta-analysis on the association between the exposure to contaminated areas to lead in water birds and biochemical biomarkers was performed. For this study, we searched databases such as Web of Science, Scopus Cab among other sources. In this context, biomarkers like delta-aminolevulinic acid dehydratase, protoporphyrin, hematocrit and hemoglobin have been showing satisfactory results of association and detection of lead exposure. Whereas catalase, ceruloplasmine and glutathione reductase are still being explored. We observed that there are biochemical alterations due to the exposure of birds to contaminated areas, but the biomarkers are affected by several factors that are still not well known. Therefore, we suggest the proposition of a protocol to measure the biochemical alterations to field studies and, meanwhile, we advise the use of multiple biomarkers, and not just one, for the detection of the exposure of birds to lead contamination.

**Keywords:** Biomarkers, biochemical, contamination, delta-aminolevulinic acid dehydratas (ALAD), exposition, quantitative synthesis.

## 1. Introduction

Lead is a trace element that can contaminate birds due to exposure to this toxicant in the atmospheric air, sediment, or soil (Nibo et al., 1996; Blus et al., 1999; Beyer et al., 2004), in aquatic plants that are part of the bird's diet (Blus et al., 1991; Blus et al., 1999), and mainly in ammunition (Erwin, 2002). Mining, smelting (Blus et al., 1999; Beyer et al., 2004; van der Merwe et al., 2011), lead-based paints and solvents, fossil fuel burning (Hui, 2002; Binkowski and Meissner, 2013), and spent lead ammunition are the main sources of contamination of the environment and waterbirds (Erwin, 2002).

Contamination is one of the main factors causing degradation and loss of wetland habitats (Dudgeon et al., 2006). Thus, waterbirds are among the most vulnerable and exposed to contamination by metals, including lead (Zaccaroni et al., 2011; Abdullah et al., 2015). The movement pattern, feeding behavior, and trophic level of birds influence their exposure to contaminants. Resident birds may be more exposed than migratory ones, as they remain in the same areas (Strum et al., 2008); diving birds (*Netta*, Sick, 1997) may be more exposed than aquatic sievers (*Anas* and *Dendrocygna*, Sick, 1997), as they are in contact with the sediment of the water body; and carnivore birds (*Plegadis chihi*, Soave et al., 2006) may be more susceptible than omnivorous birds (*Anas*, *Amazonetta* and *Dendrocygna*, Sick, 1997), due to their higher trophic level.

In birds, lead contamination affects their survival and reproduction (Mateo et al., 1999), as a result of alterations in tissues, especially bones (Merendino et al., 2005), liver, and blood (Beyer et al., 2004), and changes in behavior (Franson and Pain, 2011). Given the difficulty of observing these effects in nature, many observational studies evaluate abnormal lead exposure based on its concentration in tissues (van der Merwe et al., 2011; Binkowski and Sawicka-Kapusta, 2015; de la Casa-Resino et al., 2015) and/or biomarkers (Katavolos et al., 2007; Martinez-Haro et al., 2011a; Martinez-Haro et al., 2011b).

Biomarkers of lead can measure changes in neurological, renal, hepatic, hematologic, endocrine, gastrointestinal, cardiovascular, and reproductive processes (Tarragó, 2012). Biomarkers of oxidative stress have been increasingly used as indicators of lead exposure because of several advantages: detection of changes caused in organisms (Cogo et al., 2009), suitable to a large number of species (Cogo et al., 2009), measurement in blood without the need to euthanize the animal (Martinez-Haro et al., 2011b; de la Casa-Resino et al., 2015), low cost, easiness of preparation and measurement, sensitivity and specificity (Wang, 2011), stability, different storage conditions, and reproducibility (Dalle-Donne et al., 2005).

The biomarkers most often used in studies on trace element contamination include the enzymatic antioxidants catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD); products from lipid peroxidation, such as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measured as malondialdehyde (MDA) (Dröge, 2002); non-enzymatic antioxidant defenses, such as non thiol (NPSH; Reischl et al., 2007); the protein carbonyl (PC; Dalle-Donne et al., 2003); and the activity of the enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) (Henny et al., 2000; Martínez-Haro et al., 2011a; van der Merwe et al., 2011).

The use of biochemical markers of lead contamination is based on studies on experimental exposure (Mateo et al., 2003a; Mateo et al., 2003b; Douglas-Stroebel et al., 2004; Eeva et al., 2014). However, observational studies have shown mixed results. The sensitivity and specificity of these biomarkers as indicators of contamination in the field have not yet been evaluated.

A systematic review is a research synthesis designed to answer a specific question with explicit and systematic methods to identify, screen, critically evaluate studies, and to collect and analyze the available data (Borenstein et al., 2009; Centre for Evidence-Based Conservation, 2016). Meta-analysis is a statistical method used in a systematic review that integrates the results of at least two different studies. The advantages of a meta-analysis are increase in statistical power and accuracy, and more robust point estimate than individual studies as well as the ability to handle a large number of studies rather than only primary data analysis (Higgins and Green, 2011). It is considered the high level of evidence for decision making because it is a synthesis that includes mathematically combining a complete body of evidence (Borenstein et al., 2009; Centre for Evidence-Based Conservation, 2016).

Our aim was to evaluate the association between exposure of wild waterbirds to lead-contaminated areas and biochemical markers.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Inclusion and exclusion criteria**

We include all observational studies who have waterbirds as target species, living in the wild, and that assessed lead exposure by biochemical markers. Studies on passerine birds were excluded. We assessed measures that could be affected by lead exposition as: Acetylcholinesterase, AChE, "aminolevulinic acid dehydratase", ALAD, antioxidant enzymes, butyrylcholinesterase, BChE, catalase, CAT, ceruloplasmin, CP, cortisol, glucose, "glutathione

peroxidase", GPx, "glutathione reduced", GSH, "glutathione S-transferase", GST, "glutathione reductase", GSR, "glucose-6-phosphate dehydrogenase", G6PDH, hemoglobin\*, hematocrit\*, lactate, metallothionein\*, "non-protein sulfhydryl\*", NPSH, oxidative, "reactive oxygen species", ROS, "total protein carbonyl", "superoxide dismutase", SOD, "thiobarbituric acid reactive substances", TBARS, protoporphyrin\*.

## 2.2. Literature search

We performed structured literature searches in the databases Web of Science, Scopus, and Cab, and sources Open Gray, Open Access Theses and Dissertations, Brazilian Digital Library of Thesis and Dissertations of the Coordination and Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES), and Digital Libraries of Theses and Dissertations of the National Catalog. We used a combination of keywords and free text words representing the population (waterbirds, synonymous and genus), exposure (lead and synonymous) and outcomes (biochemical markers). Descriptive information of each biochemical marker was reviewed from books and review. Waterbirds were selected as the world bird list of Gill and Donsker (2016). The search strategy is shown in Appendix A. There was no language or date restriction. We use the reference management software Endnote Basic to aggregate the different searches.

## 2.3. Data selection and extraction

Two reviewers (FB and ME) independently screened titles and abstracts based on the inclusion and exclusion criteria. Full text of relevant studies were assessed by both authors and disagreements between the two reviews were resolved through discussion until a consensus was reached.

FB extracted the data using a specific designed tabular extraction form and ME and EW reviewed the data where necessary. Extracted data for the present study includes information on study location (country of origin), number of individuals, species, sex, and age, type of environment (marine or continental), season of collection, method of capture, material collected for biomarker analysis, biomarkers used, type of material collected for lead analysis, and method used for lead analysis.

## 2.4. Data analysis

We conducted a quantitative meta-analysis of the pooled data that had at least one uncontaminated area (no exposure or low lead exposure) and one contaminated area (with lead exposure) or at least one group of uncontaminated birds (no exposure or low exposure lead) and one contaminated (with lead exposure) group, in which we assumed that the group of contaminated birds would be equivalent-equal to the contaminated area and the group of non-contaminated birds would be equivalent-equal to the uncontaminated area. In addition, in order to be included in the meta-analysis, the study should present descriptive statistics: number of individuals, mean and standard deviation, or data that could be used to calculate these parameters. We compared biomarkers of uncontaminated areas with those of contaminated areas using the software Review Manager 5.3. We converted the descriptive statistical parameters required for the analysis with the online software Vassarstats (<http://vassarstats.net/>) by Hozo et al. (2005).

The effect size was calculated based on the difference between the mean of uncontaminated and contaminated areas divided by the standard deviation grouped according to the Cohen test (Cohen, 1992). In the studies that evaluated more than one area, contaminated or uncontaminated, a sensitivity analysis was performed, in which data on all areas were crossed.

The homogeneity of the effect size among studies was examined to determine whether they shared a common effect size. In case of heterogeneity, the studies were divided into biologically significant subgroups and the effect size for each subgroup was calculated and compared. This allowed the identification of factors explaining significant amounts of variances among effect sizes (Cooper and Hedges, 1994).

Whenever was possible, we compared lead concentrations in blood (studies: Blus 1993, Blus 1999, Henny 2000, Bayer 2004 and Binkowski 2015) and kidneys (studies: Bayer 2004 and van der Merve 2011) of animals from uncontaminated and contaminated areas.

Publication bias was evaluated through funnel plot observation (Appendix B).

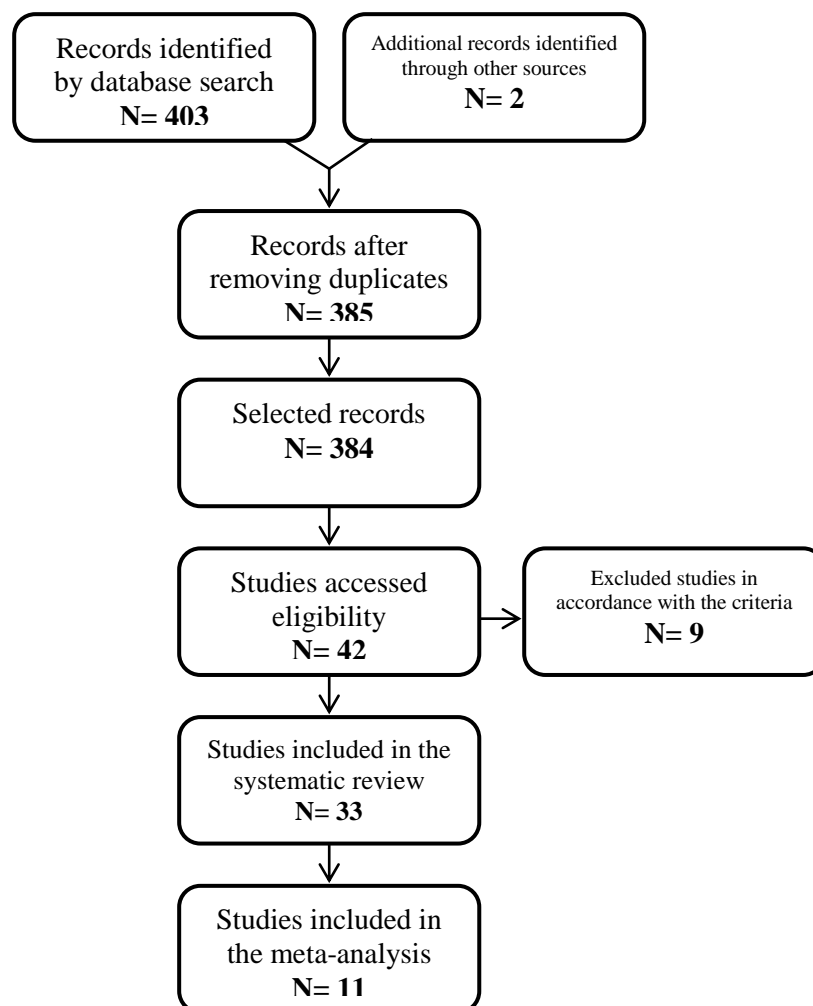
## 3. Results

We identified 384 records without duplicates and after reviewing all titles and abstracts, 42 were considered potentially relevant studies and obtained in full. Of these, 33



met the selection criteria and were included in the systematic review. However, only 11 had quantitative data to be included in the meta-analysis (Fig.1).

The included studies were conducted in nine countries, of which 14 (42.4 %) were from United States and six (18.2 %) from Spain (Table 1). The number of individuals included in each study ranged from 10 to 14,525. Seven families of waterbirds were evaluated, mainly Anatidae (21 species in 23 studies), Rallidae (four species in four studies), and Laridae (four species in three studies), totaling 23 genera, 34 species and subspecies of waterbirds. The most studied species were *Anas platyrhynchos* (nine studies) and *Branta canadensis* (seven studies). In 12 studies, findings were differentiated by sex, while 21 studies classified birds in age groups. Six studies were conducted in marine environments, 26 in continental environments and one did not identify the type of environment. The seasons of collection and methods of capture varied widely (Table 1).



**Fig. 1.** Flowchart of identification and inclusion of the study process.

**Table 1**

Characteristics of selected studies relative the country of origin, number of individuals, species, sex and age of the birds, type of environment studied, season of collection and method of capture.

Identification study	Country <sup>a</sup>	N	Species	Sex <sup>2</sup>	Age <sup>c</sup>	Environmental <sup>d</sup>	Season of collection <sup>e</sup>	Method of capture
Anderson 1985	USA*	14525	<i>Aythya affinis</i> , <i>Anas platyrhynchos</i> , <i>Aythya valisineria</i> and <i>Branta canadensis</i>	UN	UN	C	Su, S, A and W	Shot and trap containing bait
Beyer 2004	USA *	25	<i>Anas acuta</i> , <i>A. affinis</i> , <i>Anas crecca</i> , <i>Aythya collaris</i> , <i>A. platyrhynchos</i> and <i>B. canadensis</i>	UN	UN	C	Su, A and W	Stell shot and dead birds
Binkowski 2015	Poland	180	<i>A. platyrhynchos</i> and <i>Fulica atra</i>	UN	43Y 59A; 53Y 25A	C	Su and A	Lead shot
Blus 1991	USA*	68	<i>Cygnus columbianus</i>	26F 13M	16SA 23A	C	S and W	Trap
Blus 1993	USA*	3543	<i>Aix sponsa</i>	87F 42M	A	C	Su and S	Trap containing bait
Blus 1995	USA*	26	<i>A. platyrhynchos</i> , <i>Bucephala clangula</i> and <i>B. canadensis</i>	1F 3M; 6F 2M; 1M	4A; 5Y 3A; 1A	C	Su and S	Trap
Blus 1999	USA*	67	<i>C. columbianus</i>	UN	UN	C	S	Trap
Custer 2000	USA*	35	<i>A. affinis</i>	7F 28M	25Y 10A	C	S and W	Trap containing bait
de la Casa-Resino 2015	Spain	49	<i>Ciconia ciconia</i>	UN	UN	C	S	UN
Dieter 1976	USA*	208	<i>A. valisineria</i>	71F 151M	121Y 87A	C	A and W	Trap containing bait
Espin 2015	Spain	53	<i>Chroicocephalus genei</i> and <i>Ichthyaetus audouinii</i>	UN	Y I	M	S	UN
Ferreya 2015	Argentina	511	<i>Amazonetta brasiliensis</i> , <i>Dendrocygna autumnalis</i> , <i>Dendrocygna bicolor</i> , <i>Dendrocygna viduata</i> and	UN	Y A	C	A and W	Lead shot, trap and trap containing bait

Franson 1996	USA*	363	<i>Netta peposaca</i>					
Franson 2000	Finland	268	<i>A. valisineria</i>	UN	UN	C	UN	UN
Franson 2001	Finland	76	<i>Somateria mollissima</i>	F	A	M	Su and S	UN
Henny 2000	USA*	102	<i>S. mollissima</i>	F	A	M	Su and S	UN
			<i>A. platyrhynchos</i> and <i>Branta canadensis moffitti</i>	UN	86Y 16A	C	UN	Steel shot, tand trap containing bait
Kaminski 2009A	Poland	91	<i>Ciconia ciconia</i>	UN	Y	C	S	UN
Kaminski 2009B	Poland	310	<i>C. ciconia</i>	UN	Y	C	S	UN
Katavolos 2007	Canada	141	<i>B. canadensis</i> and <i>Cygnus buccinator</i>	UN	20Y	UN	Su, S, A and W	UN
Levengood 2007	USA*	60	<i>Nycticorax nycticorax</i>	UN	UN	C	UN	UN
Lucia 2012	France	15	<i>Calidris canutus</i>	UN	UN	M	Su, S, A and W	Trap
Lucia 2012B	France	31	<i>Limosa limosa</i>	12F 11M	Y Y	M	Su, S, A and W	Trap
March 1976	Canada	16	<i>B. canadensis</i>	4F 3M	5Y 2A	C	W	UN
Martinez-Haro 2011A	Spain	119	<i>Aythya ferina</i> , <i>A. platyrhynchos</i> , <i>Fulica atra</i> and <i>Gallinula chloropus</i>	40F 14M	UN	C	Su, A and W	Trap and trap containing bait
Martinez-Haro 2011B	Spain	617	<i>A. platyrhynchos</i> , <i>Fulica atra</i> and <i>Porphyrio porphyrio</i>	UN	UN	C	S and W	Trap containing bait and feces collection
Mateo 2004	Spain	10	<i>Anser anser</i> and <i>A. platyrhynchos</i>	UN	UN	C	A	Lead shot, dead birds and feces collection
Mateo 2006	Spain	270	<i>A. anser</i>	UN	UN	C	A and W	Steel shot and feces collection
Mostaghni 2005	Iran	21	<i>Larus ridibundus</i> and <i>Phoenicopterus ruber</i>	M	A	C	UN	UN
Pain 1989	USA*	229	<i>Anas rubripes</i>	UN	A	C	S, A and W	Trap
Scheuhammer 1989	Canada	510	<i>A. platyrhynchos</i> and <i>Larus argentatus</i>	UN	UN	C	Su and S	UN
Strom 2005	USA*	84	<i>Scolopax minor</i>	UN	Y	C	A	Lead and steel shot

van der Merwe 2011	USA*	28	<i>B. canadensis</i>	UN	23Y 5A	C	Su	Steel shot and trap
Youl 2009	NZ	45	<i>Porphyrio hochstetteri</i>	4F 12M	4Y 12A	M	S, A and W	Trap containing bait

<sup>a</sup> USA= United States NZ= New Zealand <sup>b</sup> UN= Uninformed M= Male F= Female <sup>c</sup> A= Adult Y= Young SA= Semi-adult N= Nestling I= Immature <sup>d</sup> C= Continental M= Marine  
<sup>e</sup> A= Autumn W= Winter S= Spring Su= Summer.

The selected studies used thirteen different biological material for the analysis of biomarkers and lead concentration, mainly blood (27 studies), liver (sixteen), and kidney (eight) (Table 2). Sixty-eight different biomarkers were analyzed in these studies, mainly ALAD activity and HEMAT (16 studies each), HEMO (nine studies), TBARS (eight), and PROTO (seven; Table 2). Six different techniques were used for direct analysis of lead (Table 2), the most common were graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS, 13 studies), atomic absorption spectrometry (AAS, 10 studies), and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP -MS, eight studies; Table 2).

**Table 2**

Characteristics of selected studies relative to biological material collected for biomarkers analysis, biomarkers used, type of material collected for lead analysis, and method used for lead analysis.

Identification study	Material collected for analysis of biomarkers	Biomarkers used	Material collected for lead analysis	Method used for lead analysis
Anderson 1985	Blood	PP	Blood	AAS
Beyer 2004	Blood	ALAD and HEMAT	Blood, liver, kidney and pancreas	ICP-MS
Binkowski 2015	Blood	ALAD, HEMO and HEMAT	Blood, bone, brain, feather, feces, gizzard contents liver, kidney, muscle and splenn	AAS and ETAAS
Blus 1991	Blood	ALAD, HEMO, HEMAT and PP	Blood, food content liver and kidney	GFAAS
Blus 1993	Blood	ALAD, HEMO, HEMAT and PP	Blood, food content and liver	GFAAS
Blus 1995	Blood	ALAD, HEMO, HEMAT and PP	Blood, food content and liver	GFAAS
Blus 1999	Blood	ALAD, HEMO and HEMAT	Blood and liver	AAS and GFAAS
Custer 2000	Liver	GSH, PESH, TBARS and TSH	UN	UN
de la Casa-Resino 2015	Blood	GSH, GST and TBARS	Blood	ICP-MS
Dieter 1976	Blood	ALAD, ALT, AST, ChE, CK and LDH	Blood	AAS
Espin 2015	Blood	ALAD, ALAD ratio and HEMAT	Blood	ASV
Ferreyra 2015	Blood	ALAD, Ca,	Blood, bone	ICP-OES

		erythrocytes, granulocytes, HEMAT, P and total solids	and liver	
Franson 1996	Blood	PP	Blood	GFAAS
Franson 2000	Blood	ALAD	Blood	GFAAS
Franson 2001	Blood	ALAD	Blood	GFAAS
Henny 2000	Blood	ALAD, HEMAT, HEMO and PP	Blood, liver and kidney	GFAAS
Kaminski 2009A	Blood	CAT, CP, GPx, GR, SOD and TBARS	Blood	AAS
Kaminski 2009B	Blood	CAT, CP, GPx, GR, SOD and TBARS	Blood	AAS
Katavolos 2007	Blood	Albumin, amylase, AST, Ca, cholesterol, CK, GDH, GGT, glucose, granulocytes, HEMO, HEMAT, LDH, lypase, MCHC, P, total bilirubin and uric acid	Blood	AAS
Levengood 2007	Blood and liver	GSH, GSSG, GSSG/GSH, PBSh, TBARS and TSH	Blood and liver	ICP-MS
Lucia 2012	Liver, kidney and muscle	CAT, GPx, MT, SOD and TBARS	Feathers, liver, kidney and muscle	ICP-OES and ICP-MS
Lucia 2012B	Liver, kidney and muscle	CAT, GPx, MT, SOD and TBARS	Feathers, liver, kidney and muscle	ICP-OES and ICP-MS
March 1976	Blood	FFA, GH, glucose, prolactin and uric acid	Blood	AAS
Martinez-Haro 2011A	Blood	ALAD, ALAD ratio, albumin, ALP, ALT, AST, Ca, cholesterol, CK, creatinine, HEMAT, GGT, glucose, GPx, GSSG, LDH, lutein, Mg, NPSH, P, PBSh, retinol, SOD, TAS, TBARS, tGSH, tocopherol, total protein, triglycerides, TSH, total bilirubin, urea, uric acid and zeaxanthin	Blood	GFAAS
Martinez-Haro 2011B	Feces	Biliverdin and porphyrin	Feces	GFAAS and ICP-MS
Mateo 2004	Feces and bile	Biliverdin and porphyrin	UN	UN
Mateo 2006	Feces, food content and bile	Biliverdin and porphyrin	Blood, bone food content,	GFAAS

Mostaghni 2005	Blood	Albumin, ALP, ALT, AST, Cd, cholesterol, CK, Cr, erythrocytes, glucose, HEMAT, HEMO, K, heterophile, leucocytes, limphocytes, MCV, MCH, MCHC, P, total protein, thrombocytes and uric acid	liver and muscle Blood	AAS
Pain 1989	Blood	ALAD, ALAD ratio, HEMAT, HEMO and zinc-protoporphyrin	Blood	AAS
Scheuhammer 1989	Blood	ALAD ratio and PP	Blood	GFAAS
Strom 2005	Blood	ALAD, ALAD ratio and HEMAT	Blood, bone and liver	GFAAS
van der Merwe 2011	Blood	ALAD and HEMAT	Blood, bone, brain, food contents, liver, kidney, muscle and pancreas	ICP-MS
Youl 2009	Blood	Albumin, albumin/globulin ratio, AST, bile acids, Ca, chloride, CK, GGT, globulin, glucose, HEMAT, K, Na, total protein and uric acid	Blood, liver and kidney	ASV and ICP-MS

ALAD= Delta-aminolevulinic acid dehydratase ALP= Alkaline phosphatase ALT= Alanine aminotransferase  
 AST= Aspartate aminotransferase ASV= Anodic stripping voltammetry AAS= Atomic absorption spectrophotometer  
 Ca= Calcium CAT= Catalase Che= Cholinesterase CK= Creatine kinase CP= Ceruloplasmine  
 ETAAS= Eletro terma - Atomic absorption spectrophotometer FFA= Free fatty acid GDH= Glutamate dehydrogenase  
 GFAAS= Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy GH= Growth hormone GPx= Glutathione peroxidase  
 GR= Glutathione reductase GSH= Reduced glutathione GSSG= Oxidized glutathione GSSG/GSH= Ratio of oxidized and reduced glutathione  
 GST= Glutathione S-transferase GGT= Gamma-glutamyltransferase HEMAT= Hematocrit HEMO= Hemoglobin ICP= Inductively coupled plasma  
 ICP-OES= Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry ICP-MS= Inductively coupled plasma - mass spectrometry  
 K= Potassium LDH= Lactate dehydrogenase MCH= Mean corpuscular hemoglobin MCHC= Mean corpuscular hemoglobin concentration  
 MCV= Mean corpuscular volume Mg= Magnesium MT= Metallothionein Na= Sodium NPSH= non protein sulfhydryl P= Phosphorus  
 PP= Protoporphyrin PESH= Protein bound sulphhydryl SOD= Superoxide dismutase TAS= Total antioxidant status TBARS= Thiobarbituric acid reactive substances  
 tGSH= Total glutathione TSH = Total sulfhydryl UN= Uninformed.

Beyer 2004 - A group of waterbirds (*B. canadensis*, *A. platyrhynchos*, *Anas acuta*, *Anas crecca*, *Aythya collaris*, and *Aythya affinis*) from a contaminated area and a group of *A. platyrhynchos* from an uncontaminated area. Information on sex and age of animals was not provided.

Blus 1993 - A group of *Aix sponsa* divided in one uncontaminated and four contaminated areas. Groups were comprised of adult females and males.

Blus 1999 - A group of *Cygnus columbianus* divided in one uncontaminated and four contaminated areas. Information on sex and age of animals was not provided.

Binkowski 2015 - A group of *Fulica atra* divided in one contaminated and one uncontaminated area. Information on the sex of animals was not provided. Groups were comprised of adult and young birds.

Custer 2015 - A group of *A. affinis* divided in one uncontaminated (immature birds) and three contaminated areas (two areas with immature birds and one with adult birds). Groups were comprised of females and males.

Henny 2000 - A group of *A. platyrhynchos* and a group of *Branta canadensis moffitti* from one contaminated and one uncontaminated area. Information on the sex of animals was not provided and only data on adults were used.

Kaminski 2009A - A group of *Ciconia ciconia* divided in one contaminated and three uncontaminated areas. Information on the sex of animals was not provided and all individuals were young birds.

Kaminski 2009B - A group of *C. ciconia* divided in one contaminated and three uncontaminated areas. Information on the sex of animals was not provided and all individuals were young birds.

March 1976 - A group of *B. canadensis* considered contaminated and a group of *B. canadensis* considered uncontaminated. Groups consisted of adult and young birds, both females and males.

Martinez-Haro 2011A - Reported levels of uric acid, glucose, TSH, TBARS for a group of contaminated *A. platyrhynchos* ( $\geq 20\mu\text{g/dL}$  of lead in blood) and a group of uncontaminated *A. platyrhynchos* ( $<20\ \mu\text{g/dL}$  of lead in blood). Levels of ALAD and HEMAT were also measured for one group of contaminated *A. platyrhynchos* ( $>50\mu\text{g/dL}$  of lead in blood) and one uncontaminated group of *A. platyrhynchos* ( $<20\ \mu\text{g/dL}$  of lead in blood). Groups were comprised of both females and males; information on age was not provided.

van der Merwe 2011 - A group of *B. canadensis* from one uncontaminated and four contaminated areas. Information on sex was not provided. Groups were composed of adult and young birds.



Of the 68 biomarkers analyzed in the studies on lead contamination in waterbirds, 12 were measured in more than one study, allowing a quantitative synthesis: uric acid, glucose, SOD, TBARS, TSH, ALAD, CAT, CP, GR, HEMAT, HEMO, and PROTO. When contaminated areas were compared to uncontaminated areas in observational studies, there was no difference regarding the level of: Uric acid (Mean difference= 5.10; 95% CI= -3.42 - 13.62;  $I^2= 76\%$ ), glucose (Mean difference= 36.02; 95% CI= -25.73 - 97.76;  $I^2= 57\%$ ), SOD (Mean difference= 87.26; 95% CI= -140.18 - 314.71;  $I^2= 96\%$ ), TBARS (Mean difference= -20.51; 95% CI= -53.48 - 12.46;  $I^2= 99\%$ ), and TSH (Mean difference= -1.09; 95% CI= -2.67 - 0.48;  $I^2= 51\%$ ) (Appendix C).

The ALAD activity was assessed in six studies. The ALAD activity including data of *A. platyrhynchos* from the study Henny 2000, was lower in birds from uncontaminated areas (Mean difference= 90.27; 95% CI = -127.14 - -53.39;  $p<0.00001$ ; Fig. 2A). However, there was also a high heterogeneity between studies ( $I^2= 98\%$ ). When the same pull of data was analyzed including data of *B. canadensis moffitti* from the study Henny 2000, there was no substantial changes in the mean difference or heterogeneity (Mean difference= -89.26; 95% CI= -125.66 - 52.87;  $p<0.00001$ ;  $I^2= 97\%$ ; Fig. 2B) (Appendix C).

In both subgroup analyses of ALAD activity assessed including *A. platyrhynchos* (Mean difference= -90.27; 95% CI = -127.14 - -53.39;  $I^2= 0$ ; Appendix C) and when grouped with *B. canadensis moffitti* from the study Henny 2000 (Mean difference= -89.09; 95% CI= -125.43 - 52.75;  $I^2= 0\%$ ; Appendix C), no differences were observed between birds from contaminated and uncontaminated areas.

The activities of CAT (Mean difference= 1.00; 95% CI= 0.67 - 1.33;  $p< 0.00001$ ;  $I^2= 14\%$ ; Fig. 3A), CP (Mean difference= -5.03; 95% CI= -6.41 - -3.64;  $p< 0.00001$ ;  $I^2= 0\%$ ; Fig. 3B), and GR (Mean difference= -62.11; 95% CI= -82.82 - -41.40;  $p< 0.00001$ ;  $I^2= 0\%$ ; Fig. 3C) (Appendix C). CAT activity was directly associated with lead concentration in the areas, while CP and GR activities remained inversely correlated.

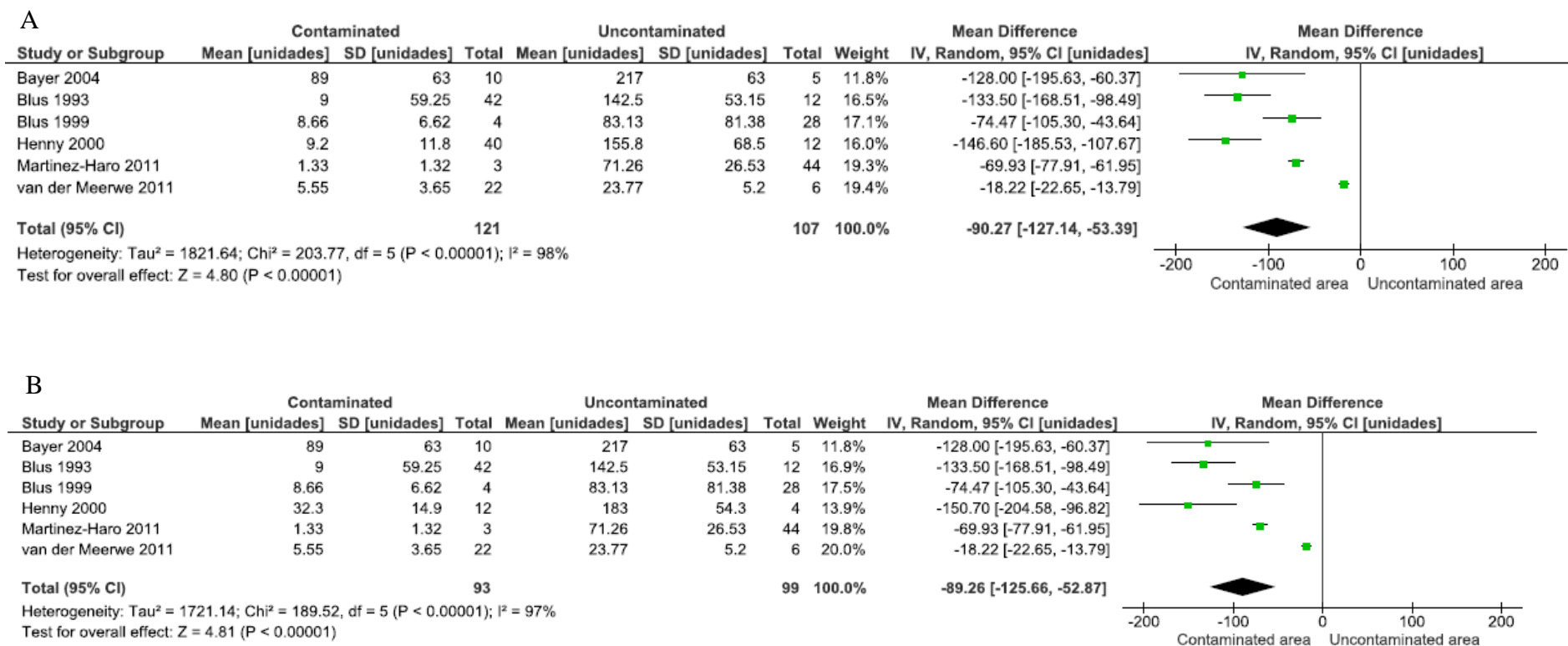
The relationship between lead contamination in the areas and HEMAT was dependent on the site of collection and on the species grouped. HEMAT, when analyzed with *B. canadensis moffitti* from the study by Henny 2000, was significantly affected by lead levels in the area (Mean difference= -2.55; 95% CI= -4.96 - -0.15;  $p= 0.04$ ;  $I^2= 66\%$ ; Appendix C; Fig. 4). The concentration of HEMO, when analyzed with *A. platyrhynchos* and when analyzed with *B. canadensis moffitti* from the study by Henny 2000 was dependent on the site of

collection. For example: HEMO when analyzed with *A. platyrhynchos* from the study by Henny 2000 (Mean difference= -1.18; 95% CI= -2.06 - -0.30;  $p= 0.008$ ;  $I^2= 46\%$ ; Fig. 5A) and HEMO when analyzed with *B. canadensis moffitti* from the same study (Mean difference= 1.59, 95% CI= 0.47 - 2.71;  $p= 0.005$ ,  $I^2= 0\%$ ; Fig. 5B) (Appendix C).

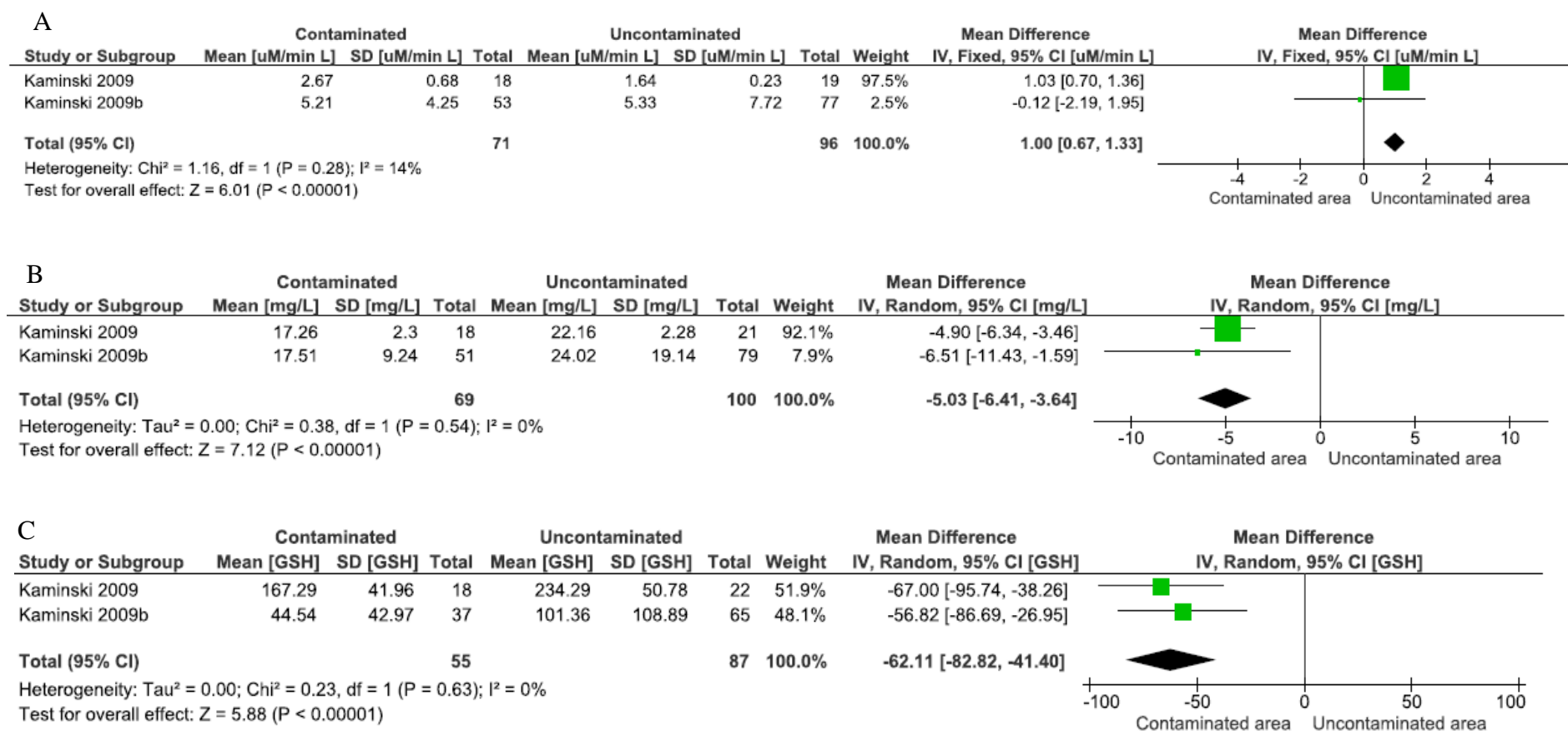
The concentrations of PROTO from birds from contaminated and uncontaminated areas, when analyzed with *A. platyrhynchos* (Mean difference= 172.42; 95% CI= 119.70 - 225.13;  $p<0.00001$ ;  $I^2= 34\%$ ; Appendix C; Fig. 6A) and when analyzed with *B. canadensis moffitti* from the study by Henny 2000, were significantly different (Mean difference= 36.43; 95% CI= 30.61 - 42.25;  $p<0.00001$ ;  $I^2= 0\%$ ; Appendix C; Fig. 6B). They were also dependent on the site of collection. For PROTO concentrations, the differences between contaminated and uncontaminated areas were directly correlated.

Lead concentrations in the blood of birds from contaminated and uncontaminated areas, when analyzed with *A. platyrhynchos* (Mean difference= 1.10; 95% CI= -0.01 - 2.22;  $p<0.05$ ;  $I^2= 89\%$ ; Appendix C; Fig. 7A) and when analyzed with *B. canadensis moffitti* (Mean difference= 1.01; 95% CI= 0.10 - 1.91;  $p<0.03$ ;  $I^2= 86\%$ ; Appendix C; Fig. 7B) from the study by Henny 2000, were significantly different and dependent on the study site. Lead concentrations in the blood were directly associated with differences between contaminated and uncontaminated areas.

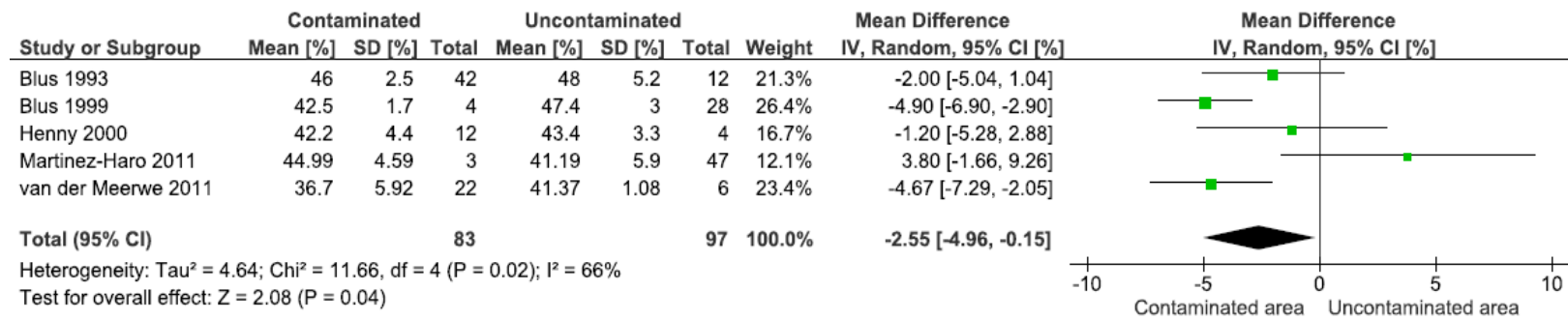
Only two studies reported lead concentration in kidney. They was a high concentration of lead in kidney of waterbirds from contaminated areas (Mean difference= 6.85; 95% CI= 6.34 - 7.53;  $p= <0.00001$ ;  $I^2= 0\%$ ; Appendix C; Fig. 8).



**Fig. 2. A.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000. **B.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.

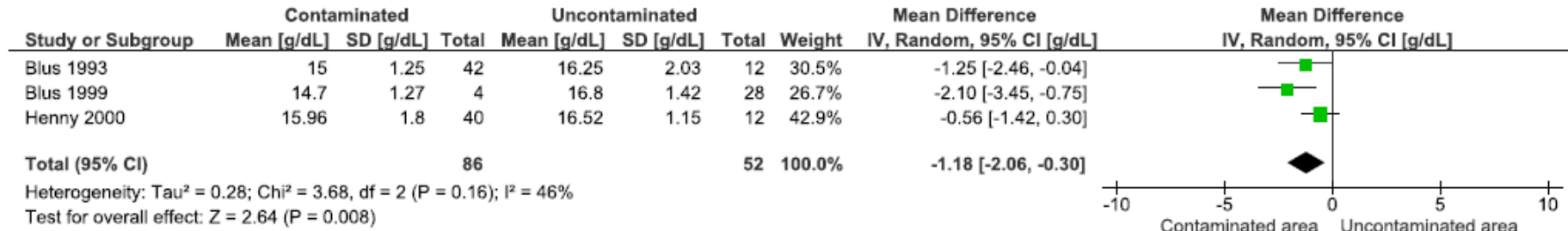


**Fig. 3. A.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and catalase activity **B.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and celluloplasmine activity. **C.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and glutathione reductase activity.

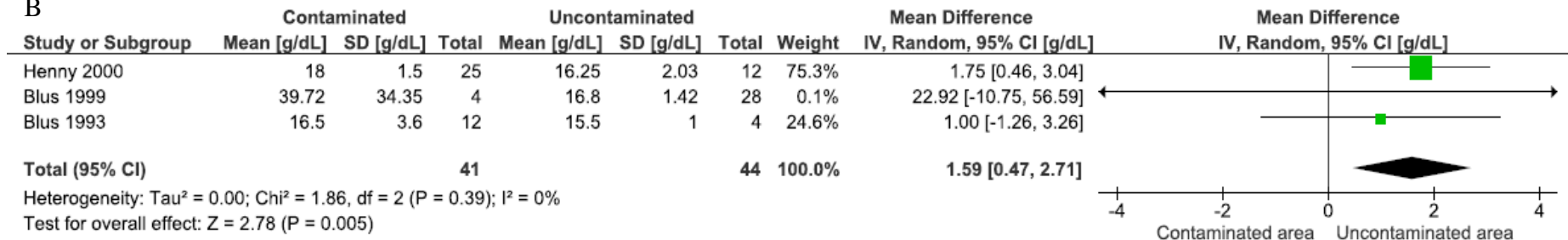


**Fig. 4.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and hematocrit with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.

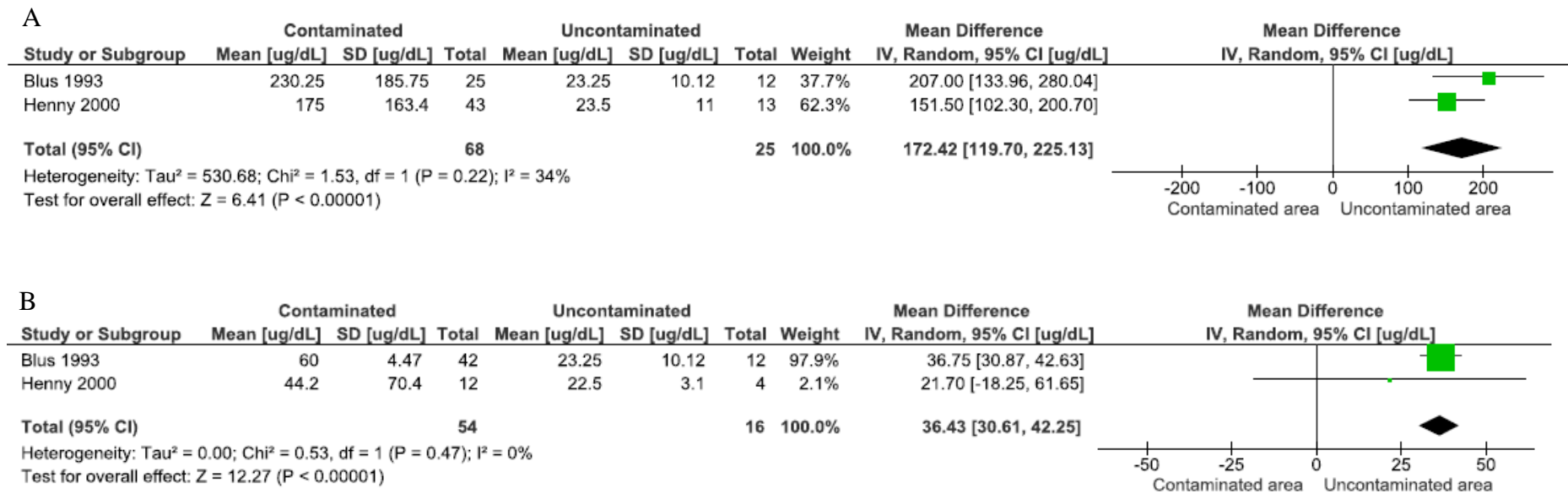
A



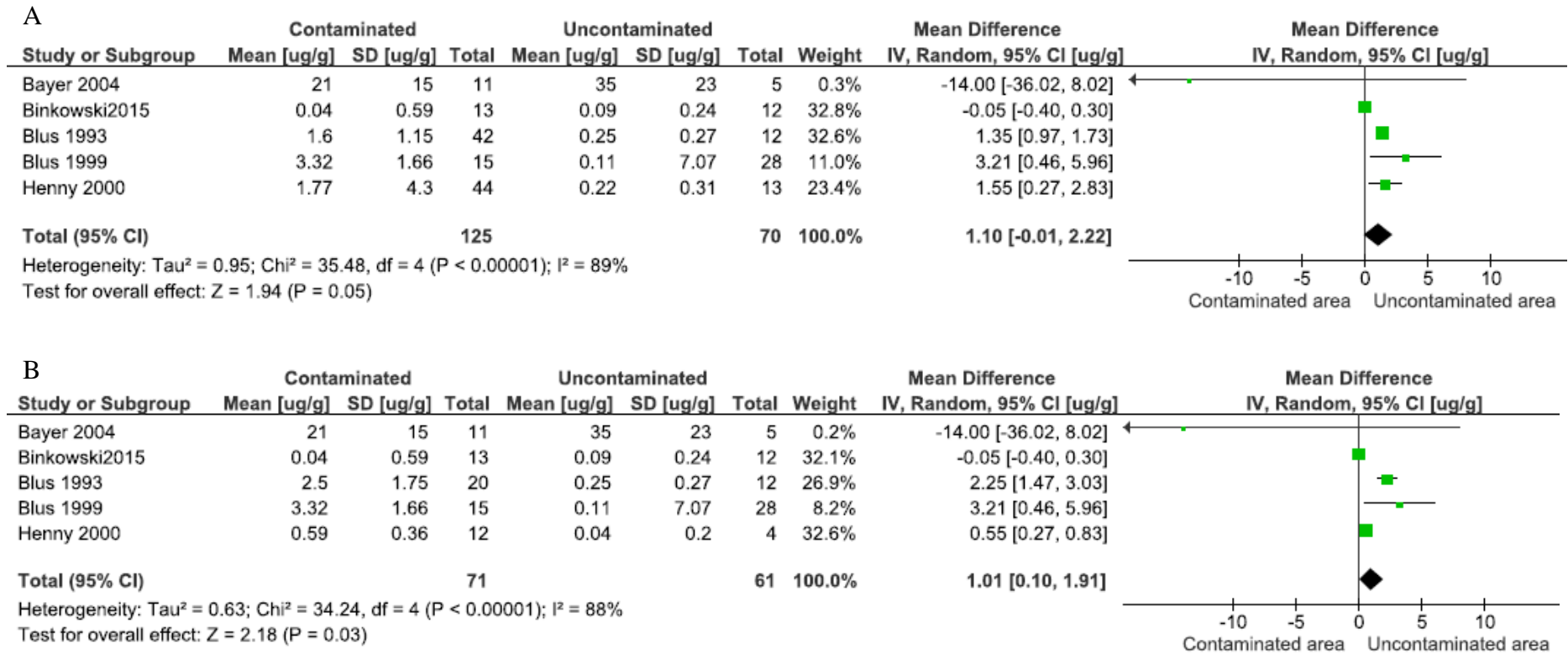
B



**Fig. 5. A.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and hemoglobin with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000. **B.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and hemoglobin with *Branta canadensis moffitti* from the sstudy Henny 2000.

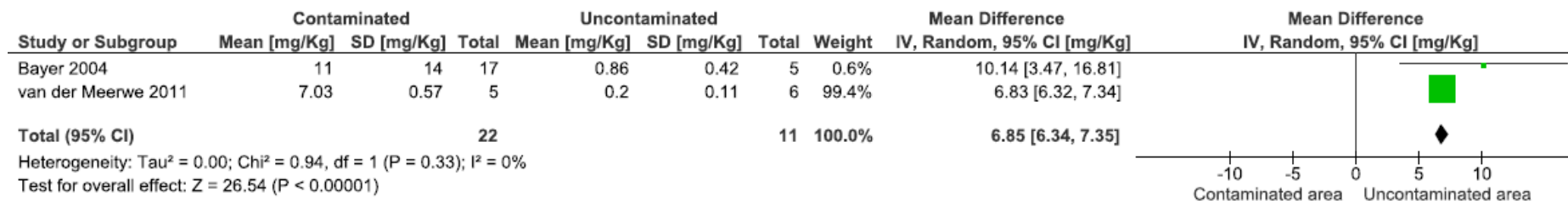


**Fig. 6. A.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and protoporphyrin with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000. **B.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and protoporphyrin with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.



**Fig. 7. A.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and lead concentration in the blood with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000. **B.** Association between lead contaminated and uncontaminated areas and lead concentration in the blood with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.





**Fig. 8.** Association between the lead contaminated and uncontaminated areas and lead concentration in kidneys.

#### 4. Discussion

In this study, we demonstrated that lead contamination is associated with significant biochemical alterations in wild waterbirds.

Waterbirds exposed to lead contaminated areas, compared to unexposed birds, tend to have higher CAT and lower ALAD, CP, and GR activities; higher levels of PROTO and lead in the blood; and lower HEMAT and HEMO. In addition, lead levels in the kidneys of wild waterbirds gradually increase as lead concentration increases in the environment. Lead contamination has been mainly associated with changes in ALAD activity and PROTO, HEMAT, and HEMO levels (Franson et al., 1996; Blus et al., 1999; Henny et al., 2000; Katavolos et al., 2007; Martinez-Haro et al., 2011b; Espin et al., 2015; Binkowski and Sawicka-Kapusta, 2015). In addition to higher lead levels in the blood and kidneys (Blus et al., 1999; Henny et al., 2000; Katavolos et al., 2007; Martinez-Haro et al. 2011a; Espin et al., 2015; Binkowski and Sawicka, 2015), little is known about the alterations reported in the present study regarding the activities of CAT, CP, and GR.

The studies available on biochemical alterations as a result of lead exposure are very heterogeneous and insufficient to accurately infer the effect size in exposed wild waterbirds. In our study, among the factors shown to influence the detection and the effect size of the differences are lead concentration in contaminated and uncontaminated environments, variability in lead concentration within and among the compared areas, bird species, and sex (Scheuhammer, 1989; Martinez-Haro et al., 2011a; Espin et al., 2015).

The biomarkers commonly analyzed, although sensitive to lead contamination, are not specific and the effect of lead can be confused with those of other contaminants in the environment (Kaminski et al., 2009a; Kaminski et al., 2009b).

Differences in exposure among species may be associated with food habits and trophic level. Birds that forage at the surface, underwater, or along the coast tend to be less exposed than birds that sieve the sediment, where the lead tends to accumulate (Gurd, 2007; Martinez-Haro et al., 2011a). Lead and other metals bioaccumulate in trophic chains and predatory birds tend to be more exposed (McBride et al., 2004; Kelly and Johnson, 2011). There may be unclear differences between sexes associated to behavior, especially during the breeding season, since most of the studies did not distinguish between females and males, potentially causing greater variability.

In many species, females remain longer in the contaminated environment, incubating the eggs and feeding the chicks (Martinez-Haro et al., 2011a). Benito et al. (1999) analyzed

the levels of As, Cd, Co, Cu, Pb in the blood of several aquatic birds and examined several factors such as species, trophic level, body mass, exposure time, and gender. The relationship among these factors and metals depend mainly on the physiological characteristics of each species associated to their ability to absorb and excrete metals (Benito et al., 1999; Burger et al., 2007). The grooming behavior of males of certain species has been pointed out as a determining factor in the concentration of metals, in which levels decrease externally and increase internally (Frantz et al., 2016).

Our meta-analysis also revealed several relationships between the measured biomarkers and lead concentrations that can aid in the interpretation of the results obtained in observational studies. We found a negative correlation between ALAD activity and HEMAT concentration in birds such as *Ichthyaetus audouinii*. The increased in HEMAT levels may be due to a balanced response associated with decreased ALAD activity in birds, which leads to a compensation in HEMAT levels in individuals exposed to high lead concentrations (Espin et al., 2015). The activity of ALAD also negatively correlates with lead concentrations in blood (Henny et al., 2000; Martinez-Haro et al., 2011a; Binkowski and Sawicka-Kapusta, 2015).

Various biomarkers, although some are non-specific to detect lead contamination, are also associated with the exposure to this metal in some situations and can be used as a complementary tool. Biomarkers, such as ALAD, and levels of HEMAT, HEMO, and PROTO tend to be correlated (Henny et al., 2000), assisting in the interpretation of the effects of contamination. The activities of enzymes CAT, CP, and GR are altered in case of excess or deficit of some metals (Kaminski et al., 2009b). In waterbirds directly exposed to diet contaminated with lead acetate (Beyer et al., 1988) and environments contaminated with lead (Buekers et al., 2009), the levels of HEMO HEMAT were reduced.

As observed in the present study, these biomarkers are not always suitable as their levels are influenced by specific characteristics associated to each study area. In addition, there may be other confounding factors such as circadian rhythm, environmental temperature, composition and availability of food resources, and parasitic infections (Dawson and Bortolotii, 1997a; Dawson and Bortolotii 1997b; Kaminski et al., 2013). In addition, sensitivity may be low. For example, lead concentrations in blood increase faster than PROTO levels generating false positives when contamination is recent (Scheuhammer, 1989; Franson et al., 1996).

The method capture of waterbirds and analytical procedures in the laboratory can also interfere with the detection of effects of contaminants, which have been neglected in studies

and it was not possible to analyze them. Creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST), enzymes released when there is muscle damage, were measured in the blood of *A. platyrhynchos* captured with bait traps, decoy traps, and rocket net. The levels of these enzymes may change depending on the time and method of containment of birds (increased with the use of decoy trap and trap rocket) (Bollinger et al., 1989). Levels of corticosterone, a stress hormone and regulator of migration, measured in the blood of *Calidris pusilla* captured with mist nets, increased with longer capture times (Mata et al., 2009).

The use of different analytical methods and even different units of measurement, such as measuring ALAD activity, make comparisons of studies difficult (Espin et al., 2015). The association between contaminant levels and biochemical activity are also known to vary among tissues and organs. For example, ALAD activity is inversely correlated with lead concentration in bones, liver, kidneys, and brain, but not muscles (Dieter and Finley, 1979; van der Merwe et al, 2011). The sensitivity of waterbirds to lead contamination may also vary depending on a number of factors that could not be examined in our meta-analysis due to the lack of sufficient studies discriminating them. For example, food and habitat preferences may vary during the life cycle of birds (Sick, 1997) and throughout the year (Drobney, 1982; Drobney and Fredrickson, 1985; Blus et al., 1993; Marco-Mendez et al, 2015).

According to our meta-analysis it is clear that wild waterbirds exposed to lead in contaminated wetlands show several biochemical alterations compared to the expected parameters in reference areas. Effect size, on the other hand, cannot be clearly inferred from lead levels in the environment due to several confounding factors that have not been examined. We strongly recommend the development of a standardized protocol for the quantification of biochemical alterations of contaminants in waterbirds for observational studies assessing chronic and acute situations, including procedures for designing and defining field and lab techniques, set of biomarkers, and statistical approaches, and identifying confounding factors. Meanwhile, based on the current knowledge, it is advisable to infer that a certain level of lead in wetlands causes biochemical alterations in waterbirds, measure several biomarkers instead of relying either on a single study or on those based on experimental exposure, preferably including several species simultaneously, stratifying and summarizing the data while taking into account the main confounding factor.

## Acknowledgments

The authors acknowledge to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) and Research Agency from the State of Rio Grande do Sul, Brazil (Fapergs).

## References

- Abdullah, M., et al., 2015. Avian feathers as a non-destructive bio-monitoring tool of trace metals signatures: A case study from severely contaminated areas. *Chemosphere* 119, 553-561.
- Benito, V., et al., 1999. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ.* 242, 309-323.
- Beyer, W.N., et al., 2004. Zinc and lead poisoning in wild birds in the Tri-State Mining District (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 108-117. doi: 10.1007/s00244-004-0010-7.
- Beyer, W.N., et al., 1988. Lead poisoning in six captive avian species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 121-130. doi: 10.1007/BF01055162.
- Binkowski, L.J., Meissner, W., 2013. Levels of metals in blood samples from Mallards (*Anas platyrhynchos*) from urban areas in Poland. *Environ. Pollut.* 178, 336-342. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.030.
- Binkowski, L.J., Sawicka-Kapusta, K., 2015. Lead poisoning and its in vivo biomarkers in Mallard and Coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127, 101-108.
- Blus, L.J., et al., 1991. Lead toxicosis in Tundra Swans near a mining and smelting complex in Northern Idaho. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 549-555.

Blus, L.J., et al., 1993. Accumulation and effects of lead and cadmium on wood ducks near a mining and smelting complex in Idaho. *Ecotoxicology* 2, 139-154. doi: 10.1007/BF00119436.

Blus, L.J., et al., 1999. Persistence of high lead concentrations and associated effects in Tundra Swans captured near a mining and smelting complex in Northern Idaho. *Ecotoxicology* 8, 125-132. doi: 10.1023/A:1008918819661 5371.

Bolinger, T., et al., 1989. Concentration of creatine kinase and aspartate aminotransferase in the blood of wild mallards following capture by three methods for banding. *J. Wildl. Dis.* 25, 225-231. doi: 10.7589/0090-3558-25.2.225.

Borenstein, M., et al., 2009. *Introduction to meta-analysis*, first ed. Wiley, West Sussex.

Buekers, J., et al., 2009. Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431-3438. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.01.044.

Burger, J., et al., 2007. Assessment of metals in down feathers of female common eiders and their eggs from the Aleutians: arsenic, cadmium, chromium, lead, manganese, mercury, and selenium. *Environ. Monit. Assess.* 143, 247-256. doi: 10.1007/s10661-007-9973-y.

Centre for Evidence-Based Conservation, 2016. Centre for Evidence-Based Conservation. <http://www.cebc.bangor.ac.uk>. (accessed 23.03. 2016).

Cohen, J., 1992. A power primer. *Psychol. Bull.* 112, 155–159.

Cogo, A.J.D., et al., 2009. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line* 7, 37-42.

Cooper, H.M., Hedges, L.V., 1994. *Handbook of research synthesis*. Russell Sage Foundation. New York.

Dalle-Donne, I., et al., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/ nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 55-99.

- Dalle-Donne, I., et al., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23-38.
- Dawson, R.D., Bortolotti, G.R., 1997a. Variation in hematocrit and total plasma proteins of nestling American kestrels (*Falco sparverius*) in the wild. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A, 383-390. doi:10.1016/S0300-9629(96)00364-7.
- Dawson, R.D., Bortolotti, G.R., 1997b. Are avian hematocrits indicative of condition? American kestrels as a model. *J. Wildl. Manage* 61, 1297-1306. doi: 10.2307/3802129.
- de la Casa-Resino. I., et al., 2015. Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97, 588-598. doi 10.1080/02772248.2015.1051484.
- Dieter, M.P., Finley, M.T., 1979.  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity in blood, brain, and liver of lead-dosed ducks. *Environ. Res.* 19, 127-135.
- Douglas-Stroebel, E., et al., 2004. Effects of lead-contaminated sediment and nutrition on mallard duckling brain growth and biochemistry. *Environ. Pollut.* 131, 215-222.
- Drobney, R.D., 1982. Body mass and composition changes and adaptations for breeding in Wood ducks. *Condor* 84, 300-305. doi: 10.2307/1367372.0-5
- Drobney, R.D., Fredrickson, L.H., 1985. Protein acquisition a possible proximate factor limiting clutch size in wood ducks. *Wildfowl* 36, 122-128.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- Dudgeon, D., et al., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163-182.

- Eeva, T., et al., 2014. Experimental manipulation of dietary lead levels in great tit nestlings: limited effects on growth, physiology and survival. *Ecotoxicology* 23, 914-928.
- Erwin, R.M., 2002. Integrated management of waterbirds: Beyond the conventional. *Waterbirds* 25, 5-12.
- Espin, S., et al., 2015. Delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ ALAD) activity in four free-living bird species exposed to different levels of lead under natural conditions. *Environ. Res.* 137, 185-198. doi: 10.1016/j.envres.2014.12.017.
- Franson, C., et al., 1996. The efficacy of protoporphyrin as a predictive biomarker for lead exposure in Canvasback Ducks: Effect of sample storage time. *Environ. Monit. Assess.* 43, 181-188. doi: 10.1007/BF00398606.
- Franson, C, Pain, D.J., 2011. Lead in birds, in: Beyer, W.N., Meador, J.P. (Eds.), *Environmental contaminants in biota. Interpreting tissue concentrations*. Taylor & Francis Group, United States of America, pp. 563-593.
- Frantz, A., et al., 2016. Sex-associated differences in trace metals concentrations in and on the plumage of a common urban bird species. *Ecotoxicology* 25, 22-29. doi: DOI 10.1007/s10646-015-1562-1.
- Gill, F., Donsker, D. (Eds.). 2016. *IOC World Bird List (v 6.1)*. doi : 10.14344/IOC.ML.6.1.
- Gurd, D.B., 2007. Predicting resource partitioning and community organization of filter-feeding dabbling ducks from functional morphology. *Am. Nat.* 169, 334-343. doi: 10.1086/510924.
- Henny, C.J., et al., 2000. Field evaluation of lead effects on Canada Geese and Mallards in the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 97-112. doi 0.1007/s002440010085.



Higgins, J.P.T., Green, S., 2011. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Version 5.1.0. The Cochrane Collaboration. [http:// www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org). (accessed 23.03.2016).

Hozo, S.P., et al., 2005. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med. Res. Methodol.* 5, 1-10.

Hui, C.A., 2002. Concentrations of chromium, manganese, and lead in air and in avian eggs. *Environ. Pollut.* 120, 201-206.

Kaminski, P., et al., 2009a. Ecophysiological determinations of antioxidant enzymes and lipoperoxidation in the blood of White Stork *Ciconia ciconia* from Poland. *Environ. Res.* 109, 29-39. doi: 10.1016/j.envres.2008.07.013.

Kaminski, P., et al., 2009b. The Impact of Element–Element Interactions on Antioxidant Enzymatic Activity in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Chicks. *Arch Environ Contam Toxicol.* 56, 325-337. doi: 10.1007/s00244-008-9178-6.

Kaminski, P., et al., 2013. Sex and other sources of variation in the haematological parameters of White stork *Ciconia ciconia* chicks. *J. Ornithol.* 155, 307-314. doi: 10.1007/s10336-013-1016-6.

Katavolos P., et al., 2007. The effect of lead poisoning on hematologic and biochemical values in trumpeter swans and Canada geese. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 341-347.

Kelly, T.R, Johnson, C.K. 2011. Lead exposure in free-flying Turkey vultures is associated with big game hunting in California. *Plos One* 6, e15350. doi: 10.1371/journal.pone.0015350.

Koivula, M.J., Eeva, T. 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* 158, 2359-2370.

Marco-Méndez, C., et al., 2015. Rice fields used as feeding habitats for waterfowl throughout the growing season. *Waterbirds* 38, 238-251. doi: /10.1675/063.038.0304.

- McBride, T.J., et al., 2004. Blood-lead and ALAD activity levels of Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*) migrating through the southern rocky mountains. *J. Raptor Res.* 38, 118-124.
- Martinez-Haro, M., et al. 2011a. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. *Environ. Res.* 111, 530:538. doi:10.1016/j.envres.2011.02.012.
- Martinez-Haro, M., et al., 2011b. Identifying sources of Pb exposure in waterbirds and effects on porphyrin metabolism using noninvasive fecal sampling. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6153-6159. doi: org/10.1021/es2009242.
- Mata, A., et al., 2009. Plasma corticosterone levels of Semipalmated Sandpiper *Calidris pusilla* overwintering in a tropical coastal lagoon of northeastern Venezuela. *Trends Comp. Endocrinol. Neurobiol.* 1163, 460-463. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03669.x.
- Mateo, R., et al., 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. *Environ. Pollut.* 104, 435-440.
- Mateo, R., et al., 2003a. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 1371-1389.
- Mateo, R., Hoffman. D.J., 2003b. Differences in oxidative stress between young Canada geese and mallards exposed to lead-contaminated sediment. *J. Toxicol. Environ. Health A* 64, 531-545.
- Merendino, M.T., et al., 2005. Regional differences and long-term trends in lead exposure in mottled ducks. *Wildl. Soc. Bull.* 33, 1002-1008.
- Nibo, S., et al., 1996. Long-range air pollution and its impact on heavy metal accumulation in dippers *Cinclus cinclus* in Normay. *Environ. Pollut.* 94, 31-38.
- Reischl, E., et al., 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 22-53.

Scheuhammer, A.M., 1989. Monitoring wild bird populations for lead exposure. *J. Wildl. Manage.* 53, 759-765. doi: 10.2307/3809209.

Sick, H., 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

Soave, G.E., et al., 2006. White-faced Ibis diet in Argentina. *Waterbirds* 29, 191-197.

Strum, K. M., et al., 2008. Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in Nearctic-Neotropical migratory shorebirds. *Ornitol. Neotrop.* 19 641-651.

Tarragó, O., 2012. Lead Toxicity. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM).

van der Merwe. D., et al., 2011. Adverse health effects in Canada geese (*Branta canadensis*) associated with waste from zinc and lead mines in the Tri-State mining district (Kansas, Oklahoma, and Missouri, USA). *J. Wildl. Dis.* 47, 650-660.

Wang, T. J., 2011. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction, *Circulation* 123, 551–565.

Zaccaroni, A., et al., 2011. Trace metal concentration in wild avian species from Campania, Italy. *Cent. Eur. J. Chem.* 9, 86-93.

## Supplementary data

### Appendix A.

List of keywords used in the systematic review.

#### Population

Actitis, actophilornis, aechmophorus, aenigmatolimnas, afroxyechus, agamia, aix, alopochen, amaurolimnas, amauroornis, amazonetta, anarhynchus, anãs, anastomus, anatidae, anhima, anhimidae, anhinga, anhingidae, anous, anser, anurolimnas, aphanapteryx, aphanocrex, aramidae, aramides, aramus, ardea, ardeidae, ardeola, arenaria, asarcornis, attagis, aythya, balaeniceps, balaenicipitidae, balearica, bartramia, biensis, biziura, bostrychia, botaurus, branta, bubulcus, bucephala, burhinidae, burhinus, butorides, cairina, calidris, callonetta, camptorhynchus, casmerodius, cercibis, cereopsis, charadriidae, charadrius, chauna, chen, chenonetta, chlidonias, chloephaga, chroicocephalus, chubbia, ciconia, ciconiidae, cladorhynchus, clangula, cochlearius, coenocorypha, coscoroba, coturnicops, creagrus, creciscus, crex, cursorius, cyanochen, cyanolimnas, cygnus, dendrocygna, dromadidae, dromas, dryolimnas, egretta, ephippiorhynchus, erythrogonys, erythromachus, esacus, eudocimus, eudromias, eupoda, eurypyga, eurypygidae, fulica, gallicrex, gallinago, gallinula, gallirallus, gavia, gaviidae, gelochelidon, geronticus, glareola, glareolidae, gorsachius, gruidae, grus, gygis, gymnocrex, haematopodidae, haematopus, hapalocrex, heliopais, heliornis, heliornithidae, heteronetta, himantopus, himantornis, histrionicus, hydrocoloeus, hydrophasianus, hydroprogne, hymenolaimus, ibidorhyncha, ibidorhynchidae, ichthyaetus, irediparra, ixobrychus, jabiru, jaçanã, jacanidae, laridae, larosterna, larus, laterallus, leptoptilos, leucophaeus, lewinia, limnodromus, limosa, lophodytes, lophonetta, lophotibis, lymnocryptes, malacorhynchus, marmaronetta, megacrex, melanitta, merganetta, mergellus, mergus, mesembrinibis, mesophoyx, metopiana, metopidius, microcarbo, microparra, micropygia, mundia, mycteria, neochen, neocrex, netta, nettapus, nomonyx, numenius, nyctanassa, nycticorax, nycticryphes, ochthodromus, onychoprion, oreopholus, oressochen, oxyura, pagophila, pardirallus, pareudiastes, pedionomidae, pedionomus, pelecanidae, pelecanus, peltohyas, phaeoaythia, phaetusa, phalacrocoracidae, phalacrocorax, phalaropus, phegornis, philacte, phimosus, phoeniconaias, phoenicoparrus, phoenicopteridae, phoenicopterus, pilherodius, platalea, plectropterus, plegadis, podica, podicephorus, podiceps, podicipedidae, podilymbus, poikilocarbo, poliocephalus, poliolimnas, polysticta, porphyrio, porzana, procelsterna, prosobonia, pseudibis, pteronetta, radjah, rallidae, rallina, rallus, recurvirostra, recurvirostridae, rhinoptilus, rhodonessa, rhodostethia, rissa, rollandia, rostratula, rostratulidae, rougetius, rufirallus, rynchops, salvadorina, sarkidiornis,

saundersilarus, scolopacidae, scolopax, scopidae, scopus, shorebird\*, sibirionetta, somateria, spatula, speculanas, sterna, sternula, sthenelides, stictonetta, stiltia, syrigma, tachybaptus, tachyeres, tadorna, thalasseus, thalassornis, theristicus, thinocoridae, thinocorus, thinornis, threskiornis, threskiornithidae, tigrionis, tigrisoma, tribonyx, tringa, vanellus, waterbird\*, waterfowl\*, xema, xenus, zapornia, zebrilus zonerodius, zonibyx, "aquatic bird\*", "wading bird\*" e "wetland bird\*".

### Exposition

Ammunition, bullet, lead, Pb, pellet, projectile\*, rifle e shotgun.

### Outcome

Acetylcholinesterase, AChE, "aminolevulinic acid dehydratase", ALAD, antioxidant enzymes, butyrylcholinesterase, BChE, catalase, CAT, ceruloplasmin, CP, cortisol, glucose, "glutathione peroxidase", GPx, "glutathione reduced", GSH, "glutathione S-transferase", GST, "glutathione reductase", GSR, "glucose-6-phosphate dehydrogenase", G6PDH, hemoglobin\*, hematocrit\*, lactate, metallothionein\*, "non-protein sulfhydryl\*", NPSH, oxidative, "reactive oxygen species", ROS, "total protein carbonyl", "superoxide dismutase", SOD, "thiobarbituric acid reactive substances", TBARS, protoporphyrin\*.

### Appendix B.

Testing for publication with funnel plots. An asymmetryc funnel plot in as indication for publication bias.

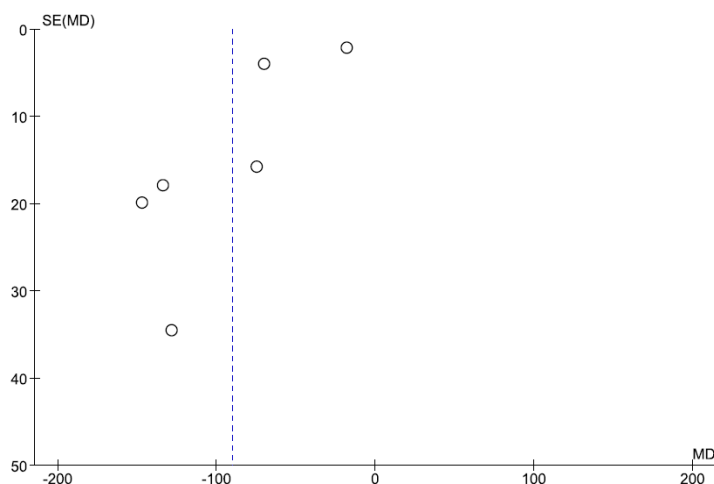


Fig. A.1. Funnel plot for six studies grouped to test delta-aminolevulinic acid dehydratase with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000.

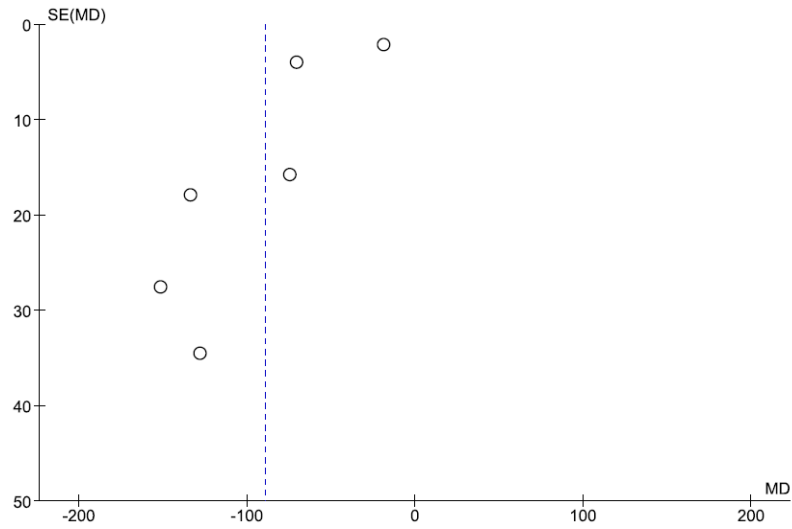


Fig A.2. Funnel plot for six studies grouped to test delta-aminolevulinic acid dehydratase with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.

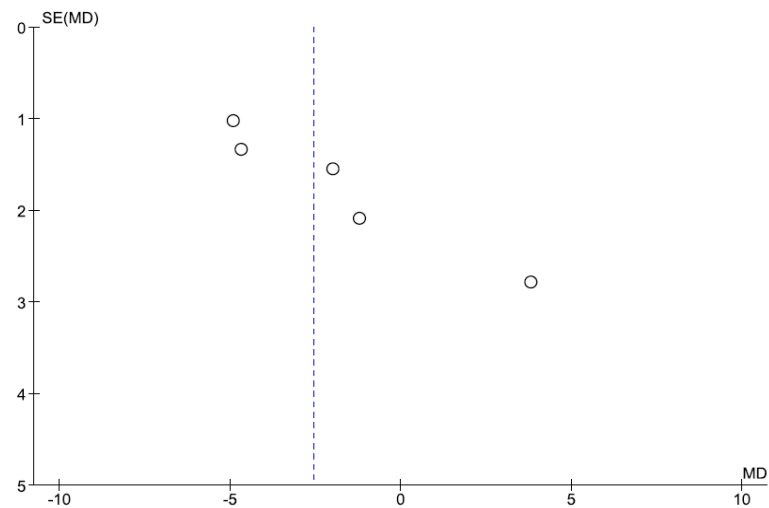


Fig A.3. Funnel plot for five studies grouped to test hematocrit with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.

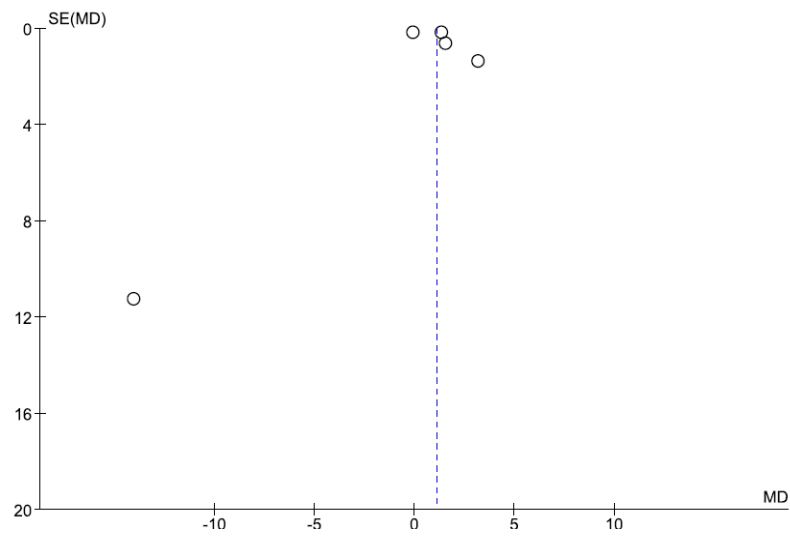


Fig A.4. Funnel plot for five studies grouped to test blood with *Anas platyrhynchos* from the study Henny 2000.

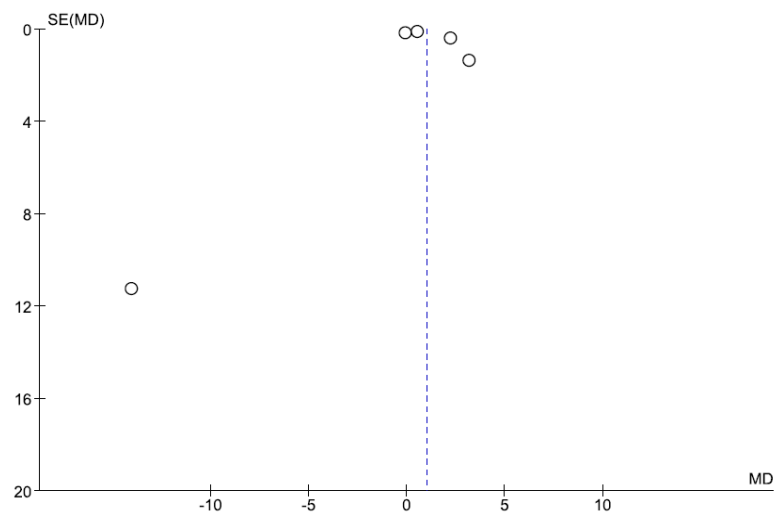


Fig A.5. Funnel plot for five studies grouped to test blood lead with *Branta canadensis moffitti* from the study Henny 2000.

## Appendix C.

Table A.1

Results of meta-analysis.

C1= Contaminated area 1 C2= Contaminated area 2 C3= Contaminated area 3 C4= Contaminated area 4 NC1= Uncontaminated area 1 NC2= Uncontaminated area 2 NC3= Uncontaminated area 3 NC4= Uncontaminated area 4.

Biomarkers	Groups		
	Effect size (95% CI)	p	I <sup>2</sup> (%)
Uric acid			
C1xNC1	5.10[-3.42, 13.62]	0.24	76
Delta-aminolevulinic acid dehydratase with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-83.52[-119.57, 47.47]	<0.00001	97
C1xC3	-88.02[-124.47, 51.58]	<0.00001	98
C1xC4	-88.07[-124.52, 51.61]	<0.00001	98
C2xC1	-88.48[-125.06, 51.90]	<0.00001	98
C2xC3	-88.27[-124.79, 51.75]	<0.00001	98
C2xC4	-88.31[-124.84, 51.79]	<0.00001	98
C3xC1	-90.27[-127.14, 53.39]	<0.00001	98
C3xC2	-85.53[-121.94, 49.11]	<0.00001	97
C3xC4	-90.10[-126.92, 53.28]	<0.00001	98
C4xC1	-88.20[-124.47, 51.94]	<0.00001	97
C4xC2	-83.44[-119.23, 47.65]	<0.00001	97
C4xC3	-87.99[-124.20, 51.78]	<0.00001	97
C1xC1	-88.23[-124.74, 51.72]	<0.00001	98
C2xC2	-83.77[-119.89, 47.65]	<0.00001	97
C3xC3	-90.06[-126.87, 53.24]	<0.00001	98
C4xC4	-88.04[-124.25, 51.82]	<0.00001	97
Delta-aminolevulinic acid dehydratase with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-82.31[-117.84; 46.77]	<0.00001	97
C1xC3	-86.96[-122.93; 50.99]	<0.00001	97
C1xC4	-87.00[-122.98; 51.03]	<0.00001	97
C2xC1	-87.44[-123.54; 51.33]	<0.00001	97
C2xC3	-87.22[-123.26; 51.18]	<0.00001	97
C2xC4	-87.26[-123.31; 51.22]	<0.00001	97
C3xC1	-89.26[-125.66; 52.87]	<0.00001	97
C3xC2	-84.35[-120.26; 48.45]	<0.00001	97
C3xC4	-89.09[-125.43; 52.75]	<0.00001	97
C4xC1	-87.08[-122.83; 51.32]	<0.00001	97
C4xC2	-82.13[-117.38; 46.89]	<0.00001	97
C4xC3	-86.86[-122.55; 51.16]	<0.00001	97
C1xC1	-87.18[-123.20, 51.15]	<0.00001	97
C2xC2	-82.57[-118.18, 46.95]	<0.00001	97
C3xC3	-89.04[-125.38, 52.71]	<0.00001	97
C4xC4	-86.90[-122.60, 51.20]	<0.00001	97
Catalase			
NC1xNC2	1.94[-0.23, 4.11]	0.08	92
NC1xNC3	0.87[0.52, 1.22]	<0.00001	0
NC2xNC1	2.00[-2.15, 6.16]	0.34	98
NC2xNC3	-0.08[-0.44, 0.28]	0.66	0
NC3xNC1	2.54[-0.52, 5.61]	0.10	96
NC3xNC2	2.00[-0.05, 4.04]	0.06	91
NC1xNC1	2.48[-0.71, 5.68]	0.13	96
NC2xNC2	1.47[-1.66, 4.60]	0.36	96
NC3xNC3	1.00[0.67, 1.33]	0.0001	14
Ceruleoplasmine			



NC1xNC2	0.39[-5.58, 6.36]	0.90	90
NC1xNC3	-2.78[-4.20, -1.36]	0.0001	58
NC2xNC1	-4.81[-6.18, -3.44]	<0.00001	0
NC2xNC3	-5.03[-6.41, -3.64]	<0.00001	0
NC3xNC1	-3.08[-4.46, -1.70]	<0.0001	0
NC3xNC2	0.14[-6.37, 6.64]	0.97	91
NC1xNC1	-2.60[-4.01, -1.20]	0.0003	0
NC2xNC2	-0.78[-9.17, 7.62]	0.86	95
NC3xNC3	-3.27[-4.66, -1.88]	<0.00001	47
Glucose			
C1xNC1	36.02[-25.73, 97.76]	0.25	57
Glutathione reductase			
NC1xNC2	-124.16[-305.80, 57.48]	0.18	100
NC1xNC3	-113.17[-316.24, 89.90]	0.27	100
NC2xNC1	-102.14[-111.84, 92.44]	<0.00001	52
NC2xNC3	-57.31[-150.54, 35.93]	0.23	100
NC3xNC1	-104.79[-116.60, 92.99]	<0.00001	66
NC3xNC2	-70.80[-147.48, 5.88]	0.07	99
NC1xNC1	-62.11[-82.82, -41.40]	<0.00001	0
NC2xNC2	19.88[-28.85, 68.61]	0.42	91
NC3xNC3	24.21[11.27, 37.15]	0.0002	61
Hematocrit with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-0.39[-2.69, 1.91]	0.74	71
C1xC3	-1.18[-3.79, 1.43]	0.38	71
C1xC4	-1.58[-4.42, 1.26]	0.27	82
C2xC1	-2.05[-7.31, 3.22]	0.45	94
C2xC3	-0.57[-3.61, 2.47]	0.71	78
C2xC4	-0.97[-4.20, 2.26]	0.55	86
C3xC1	-2.20[-7.34, 2.94]	0.40	94
C3xC2	0.03[-2.44, 2.51]	0.98	75
C3xC4	-1.13[-4.24, 1.98]	0.48	85
C4xC1	-3.03[-7.78, 1.71]	0.21	93
C4xC2	-0.78[-3.11, 1.56]	0.51	72
C4xC3	-1.61[-4.15, 0.94]	0.22	70
C1xC1	-2.62[-7.53, 2.29]	0.30	94
C2xC2	0.18[-2.41, 2.77]	0.89	77
C3xC3	-0.72[-3.61, 2.16]	0.62	76
C4xC4	-2.00[-4.70, 0.69]	0.15	81
Hematocrit with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-0.62[-3.27, 2.03]	0.65	69
C1xC3	-1.55[-4.29, 1.19]	0.27	62
C1xC4	-1.99[-4.75, 0.77]	0.16	74
C2xC1	-2.32[-7.96, 3.32]	0.42	93
C2xC3	-0.83[-4.29, 2.63]	0.64	76
C2xC4	-1.24[-4.68, 2.19]	0.48	83
C3xC1	-2.48[-7.96, 3.01]	0.38	93
C3xC2	-0.14[-3.05, 2.77]	0.92	75
C3xC4	-1.42[-4.68, 1.85]	0.39	81
C4xC1	-3.38[-8.05, 1.29]	0.16	90
C4xC2	-1.05[-3.66, 1.56]	0.43	69
C4xC3	-2.11[-4.54, 0.32]	0.09	53
C1xC1	-2.93[-7.96, 2.11]	0.25	91
C2xC2	0.03[-3.04, 3.09]	0.99	77
C3xC3	-1.00[-4.26, 2.26]	0.55	74
C4xC4	-2.55[-4.96, -0.15]	0.04	66
Hemoglobin with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-0.56[-2.26, 1.13]	0.52	89
C1xC3	-2.41[-4.73, -0.09]	0.04	93
C1xC4	-1.55[-2.73, -0.37]	0.010	69
C2xC1	0.66[-1.70, 3.01]	0.59	81

C2xC3	-1.10[-4.31, 2.10]	0.50	96
C2xC4	-0.30[-2.24, 1.63]	0.76	88
C3xC1	0.06[-1.39, 1.51]	0.93	56
C3xC2	0.36[-0.68, 1.40]	0.50	71
C3xC4	-0.62[-2.03, 0.79]	0.39	78
C4xC1	-0.82[-1.78, 0.14]	0.09	27
C4xC2	-0.23[-1.51, 1.05]	0.72	82
C4xC3	-2.08[-4.40, 0.25]	0.08	93
C1xC1	-1.29[-3.09, 0.52]	0.16	71
C2xC2	0.66[-0.64, 1.96]	0.32	81
C3xC3	-1.43[-4.26, 1.40]	0.32	95
C4xC4	-1.18[-2.06, -0.30]	0.008	46
Hemoglobin with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-0.14[-2.48, 2.19]	0.90	89
C1xC3	-2.07[-4.72, 0.58]	0.13	89
C1xC4	-1.38[-3.00, 0.24]	0.10	70
C2xC1	1.59[0.47, 2.71]	0.005	0
C2xC3	-0.62[-5.04, 3.80]	0.78	96
C2xC4	0.18[-2.47, 2.83]	0.89	88
C3xC1	0.84[-0.29, 1.96]	0.14	0
C3xC2	0.91[0.24, 1.58]	0.007	0
C3xC4	-0.20[-2.29, 1.90]	0.85	81
C4xC1	-0.16[-2.64, 2.32]	0.90	59
C4xC2	0.18[-1.45, 1.81]	0.83	78
C4xC3	-1.70[-4.62, 1.22]	0.25	91
C1xC1	-0.51[-3.92, 2.89]	0.77	75
C2xC2	1.18[0.51, 1.85]	0.0005	0
C3xC3	-0.97[-4.84, 2.90]	0.62	95
C4xC4	-1.04[-2.49, 0.41]	0.16	62
Superoxido dismutase			
NC1xNC2	5.45[-268.74, 279.63]	0.97	96
NC1xNC3	58.33[-111.48, 226.83]	0.5	93
NC2xNC1	55.37[-236.06, 346.80]	0.71	97
NC2xNC3	87.26[-140.18, 314.71]	0.45	96
NC3xNC1	50.92[-232.12, 333.97]	0.72	97
NC3xNC2	30.69[-292.07, 353.45]	0.85	97
NC1xNC1	26.27[-207.21, 259.75]	0.83	95
NC2xNC2	34.61[-297.52, 366.74]	0.84	98
NC3xNC3	82.74[-136.31, 301.80]	0.46	96
Protoporphyrin with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xNC1	197.90[105.79, 290.01]	<0.0001	84
C2xNC1	172.42[119.70, 225.13]	<0.00001	34
C3xNC1	91.42[-20.91, 203.75]	0.11	95
C4xNC1	131.18[95.36, 166.99]	0.00001	17
Protoporphyrin with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xNC1	132.87[-86.45, 352.18]	0.24	98
C2xNC1	111.60[-69.68, 292.87]	0.23	95
C3xNC1	36.43[30.61, 42.25]	<0.00001	0
C4xNC1	67.84[-23.34, 159.02]	0.14	90
Thiobarbituric acid reactive substances			
C1xNC1	-20.51[-53.48, 12.46]	0.22	99
C2xNC1	-3.99[8.56, 0.58]	0.09	0
C3xNC1	-3.31[-7.74, 1.12]	0.14	0
Total sulfhydryl			
C1xNC1	-0.01[-0.92, 0.91]	0.99	0
C2xNC1	0.05[-1.19, 1.30]	0.94	0
C3xNC1	-1.09[-2.67, 0.48]	0.17	51
Lead kidney			
C1xNC1	6.85[6.34, 7.35]	<0.00001	0
C2xNC1	5.03[-3.63, 13.69]	0.26	85

C3xNC1	4.93[-3.96, 13.82]	0.28	86
C4xNC1	5.27[-2.81, 13.35]	0.20	83
Blood lead with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	1.08[-0.42, 2.57]	0.16	88
C1xC3	1.45[-0.13, 3.04]	0.07	89
C1xC4	1.27[-0.26, 2.80]	0.10	88
C2xC1	1.56[-0.13, 3.25]	0.07	90
C2xC3	1.49[-0.15, 3.12]	0.07	90
C2xC4	1.30[-0.28, 2.88]	0.11	89
C3xC1	0.71[-0.09, 1.52]	0.08	76
C3xC2	0.52[-0.14, 1.19]	0.13	67
C3xC4	0.61[-0.10, 1.31]	0.09	71
C4xC1	1.12[-0.03, 2.27]	0.06	89
C4xC2	0.84[-0.22, 1.90]	0.12	88
C4xC3	1.10[-0.01, 2.22]	0.05	89
C1xC1	1.52[-0.12, 3.17]	0.07	89
C2xC2	1.10[-0.44, 2.65]	0.16	89
C3xC3	0.72[-0.06, 1.50]	0.07	76
C4xC4	0.97[-0.11, 2.05]	0.08	88
Blood lead with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	0.81[-0.04, 1.66]	0.06	87
C1xC3	1.01[0.10, 1.91]	0.03	86
C1xC4	0.90[0.03, 1.78]	0.04	87
C2xC1	1.05[0.09, 2.01]	0.03	89
C2xC3	1.05[0.11, 1.98]	0.03	89
C2xC4	0.94[0.04, 1.84]	0.04	88
C3xC1	0.45[-0.05, 0.95]	0.08	74
C3xC2	0.39[-0.02, 0.79]	0.06	63
C3xC4	0.42[-0.02, 0.85]	0.06	67
C4xC1	0.74[-0.01, 1.50]	0.05	88
C4xC2	0.61[-0.09, 1.31]	0.09	87
C4xC3	0.75[0.01, 1.49]	0.05	88
C1xC1	1.01[0.08, 1.94]	0.03	89
C2xC2	0.84[-0.05, 1.72]	0.06	88
C3xC3	0.46[-0.03, 0.94]	0.07	73
C4xC4	0.68[-0.04, 1.39]	0.06	87
Sub-grupos			
Delta-aminolevulinic acid dehydratase with <i>Anas platyrhynchos</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-83.52[-119.57, -47.47]	0.86	0
C1xC3	-88.02[-124.47, -51.58]	0.99	0
C1xC4	-88.07[-124.52, -51.61]	0.99	0
C2xC1	-88.48[-125.06, -51.90]	1.00	0
C2xC3	-88.27[-124.79, -51.75]	0.99	0
C2xC4	-88.31[-124.84, -51.79]	1.00	0
C3xC1	-90.27[-127.14, -53.39]	0.95	0
C3xC2	-85.53[-121.94, -49.11]	0.93	0
C3xC4	-90.10[-126.92, -53.28]	0.95	0
C4xC1	-88.20[-124.47, -51.94]	1.00	0
C4xC2	-83.44[-119.23, -47.65]	0.87	0
C4xC3	-87.99[-124.20, -51.78]	0.99	0
C1xC1	-88.23[-124.74, -51.72]	0.99	0
C2xC2	-83.77[-119.89, -47.65]	0.87	0
C3xC3	-90.06[-126.87, -53.24]	0.95	0
C4xC4	-88.04[-124.25, -51.82]	0.99	0
Delta-aminolevulinic acid dehydratase with <i>Branta canadensis moffitti</i> from the study Henny 2000			
C1xC2	-82.31[-117.84, -46.77]	0.85	0
C1xC3	-86.96[-122.93, -50.99]	0.98	0
C1xC4	-87.00[-122.98, -51.03]	0.98	0
C2xC1	-87.44[-123.54, -51.33]	0.99	0
C2xC3	-87.22[-123.26, -51.18]	0.99	0

C2xC4	-87.26[-123.31, -51.22]	0.99	0
C3xC1	-89.26[-125.66, -52.87]	0.95	0
C3xC2	-84.35[-120.26, -48.45]	0.92	0
C3xC4	-89.09[-125.43, -52.75]	0.96	0
C4xC1	-87.08[-122.83, -51.32]	0.99	0
C4xC2	-82.13[-117.38, -46.89]	0.85	0
C4xC3	-86.86[-122.55, -51.16]	0.99	0
C1xC1	-87.18[-123.20, -51.15]	0.99	0
C2xC2	-82.57[-118.18, -46.95]	0.86	0
C3xC3	-89.04[-125.38, -52.71]	0.96	0
C4xC4	-86.90[-122.60, -51.20]	0.99	0

---

### 3 ARTIGO 2

Artigo formatado nas normas da revista Ecotoxicology

#### **Biomarcadores de estresse oxidativo e contaminação por elementos-traço de aves aquáticas em diferentes sistemas de lavouras de arroz irrigado**

**F.B. Bergmann<sup>1</sup>, J. Leitemperger<sup>2</sup>, M.B. Jorge<sup>3</sup>, H.L.C. Amaral<sup>4</sup>, A. Bianchini<sup>3</sup>, V.L. Loro<sup>1</sup>, D.L. Guadagnin<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Cidade Universitária, Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Cidade Universitária, Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália Km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Laboratório de Ecologia de Parasitos e Vetores, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, RS, Brasil

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Setor 4, Prédio 43411, Sala 218, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

**Resumo** Alguns elementos-traço como cobre e zinco são essenciais aos organismos vivos em pequenas concentrações, mas podem se tornar tóxicos a altas concentrações. Outros, sem função biológica conhecida, como cádmio e chumbo são importantes contaminantes ambientais. O aumento de elementos-traço em ambientes aquáticos pode se tornar nocivo às aves aquáticas, causando diversas alterações nestes organismos. Neste estudo, fizemos uma comparação das concentrações de elementos-traço e o perfil de biomarcadores em aves aquáticas que frequentam diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado. Para isto realizamos coletas de aves aquáticas com arma de fogo em dois sistemas de cultivos de arroz irrigado: orgânico e não orgânico. Separamos amostras de penas (para determinação das concentrações de elementos-traço), fígado e músculo (para a determinação do perfil dos biomarcadores). Observamos maiores concentrações de cádmio e zinco nas penas das aves que utilizaram o sistema de lavouras orgânico e maiores concentrações de chumbo e cobre nas penas das que utilizaram o sistema de lavouras não orgânico. Observamos que substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, tióis não proteicos e proteína carbonil apresentaram maiores níveis no sistema de lavouras orgânico, tanto no fígado quanto no músculo e que superóxido dismutase e catalase apresentaram maiores atividades no sistema de lavouras não orgânico. Concluímos que as aves aquáticas que frequentam lavouras de arroz apresentam diferenças quanto à exposição a elementos-traço e diferenças no seu perfil de biomarcadores. Entretanto, não verificamos uma associação consistente entre a exposição e os efeitos bioquímicos. Sugerindo que diversos fatores, internos e externos, não controlados podem afetar estas relações.

**Palavras-chave** Anatidae, antioxidantes, metais, penas, Threskiornithidae

## Introdução

Os elementos-traço, embora raros, exercem influência significativa nos ecossistemas aquáticos. Alguns como cobre (Cu) e zinco (Zn) são essenciais aos organismos vivos em pequenas concentrações e se tornam tóxicos a altas concentrações. Outros, sem função biológica conhecida, como cádmio (Cd) e chumbo (Pb), são importantes contaminantes (Heath 1995; Rodgher et al. 2005; Andreani et al. 2008).

Estes elementos podem ocorrer de forma natural ou como resultado de atividades antrópicas (Lucia et al. 2010). Em ambientes agrícolas, tais como sistemas de cultivo de arroz, alguns dos principais elementos-traço encontrados nos fertilizantes e nos pesticidas não orgânicos são: Cd, Pb, Cu e Zn (Gimeno-García et al. 1996).

Os elementos-traço afetam a saúde e a sobrevivência das aves de diversas formas. Podem retardar o empenamento (Takekawa et al. 2002; Janssens et al. 2003), o desenvolvimento nervoso (Eisler 1988), a reprodução (Burger 1993; Furness 1996; Dauwe et al. 2003), alterar o comportamento (Furness 1996), induzir formas reativas de oxigênio (Kaminski et al. 2009a, b; de la Casa-Resino et al. 2015), causar lesões em tecidos e sistemas, especialmente o endócrino (Martin et al. 2003) e induzir mutagênese, teratogenia e carcinogenia (Eisler 1985, 1988, 1993, 1998, 2000).

Os elementos-traço geralmente estão concentrados em órgãos específicos que podem ou não ser os seus locais de ação. A meia vida biológica de um elemento-traço pode ser longa e conforme o mesmo é biotransformado ou excretado ele é liberado ou concentra-se no local de armazenamento. Por exemplo, o fígado apresenta alta capacidade de ligação às substâncias químicas, concentrando mais elementos-traço do que todos os órgãos combinados (Klaassen e Walkins 2012). Enquanto que o músculo pode funcionar como um local de estoque de elementos-traço (Lewis e Furness 1991). Dadas estas diferenças de metabolismo e meia vida, cada órgão ou tecido informa sinais diferentes e complementares de contaminação. Penas, sangue e excretas permitem diagnosticar exposição aguda (Rattner et al. 2009); a concentração em ossos se relaciona com exposição crônica e fígado, rins e músculo com situações intermediárias (Ancora et al. 2008).

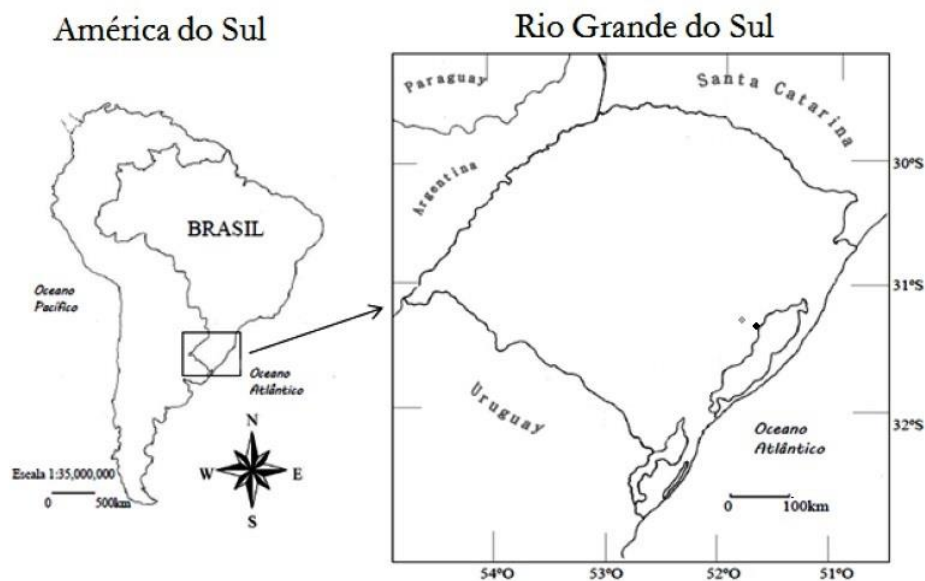
Biomarcadores são importantes na avaliação precoce do grau de exposição à intoxicação por elementos-traço (Klaassen e Watkins 2012). Têm sido frequentemente associados a sinais precoces de intoxicação biomarcadores de estresse oxidativo como antioxidantes enzimáticos (catalase - CAT e superóxido dismutase - SOD), peróxidos lipídicos: como o malondialdeído (MDA) medidos em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Dröge 2002), defesas antioxidantes não enzimáticas, como tióis não proteicos (NPSH; Reischl et al. 2007) e a proteína carbonil (PC; Dalle-Donne et al. 2003). Estes biomarcadores podem ser obtidos a partir de diferentes tecidos, como sangue, fígado e músculo (Custer et al. 2000; Kaminski et al. 2009a, b; de la Casa-Resino et al. 2015).

Neste estudo comparamos a concentração de elementos-traço e o perfil de biomarcadores em aves aquáticas que frequentam sistemas de cultivo de arroz irrigado orgânico e não orgânico. Especificamente, testamos as seguintes hipóteses: a) que existem diferenças na exposição de aves aquáticas a elementos-traço em sistemas de cultivo de arroz orgânico e não orgânico; b) que existem diferenças entre as aves aquáticas que frequentam o sistema de cultivo de arroz orgânico e as que frequentam o sistema não orgânico quanto ao perfil dos biomarcadores de estresse oxidativo: TBARS, NPSH e PC em fígado e músculo, e na atividade das enzimas SOD e CAT em fígado; c) que existe associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo a exposição aos elementos- traço.

## Material e Métodos

### Área de estudo

A área do estudo compreendeu dois sistemas de lavouras de cultivo de arroz irrigado: um orgânico e um não orgânico, respectivamente nos municípios de Sentinela do Sul e Tapes ambos situados no bioma Pampa (Fig. 1). A região localiza-se no bioma Pampa (IBGE 2012). A temperatura média da região é de 18,8 °C e a precipitação pluvial anual é de 1213 mm, sendo que o tipo climático é considerado subtropical úmido (Maluf 2000).



**Fig. 1** Localização dos municípios Sentinela do Sul (círculo cinza) e Tapes (círculo preto), Rio Grande do Sul, Brasil. Fonte: Adaptado de Sacco et al. (2013).

### Coleta das aves e preparação do material biológico

Coletamos aves aquáticas por meio de abate com arma de fogo dentro de lavouras de arroz irrigado ou no seu entorno em um sistema de lavouras de cultivo de arroz orgânico (outubro de 2013) e um sistema de lavouras de cultivo de arroz não orgânico, ou seja, que utiliza insumos químicos industriais (novembro de 2014; Autorização para coleta SISBIO 35297-8). Sexamos e medimos a massa corporal e o comprimento de todos os espécimes. Os espécimes coletados foram refrigerados e encaminhados ao Museu de História Natural da Universidade Católica de Pelotas para a realização da dissecação e separação dos materiais biológicos. Coletamos amostras aleatórias de penas de diversas partes do corpo para a análise de contaminação por Cd, Pb, Cu e Zn. Secamos e estocamos as amostras à temperatura ambiente para serem analisadas na Universidade Federal do Rio Grande. Coletamos amostras em duplicata de fígado e músculo para análises de estresse oxidativo, as quais foram mantidas congeladas a -5° C até a realização das análises. Transportamos as amostras

em um botijão criogênico de 3,15 L Cryofarm YD53 à temperatura de aproximadamente  $-196^{\circ}\text{C}$  para serem analisadas no Laboratório de Toxicologia Aquática da Universidade Federal de Santa Maria.

### **Análise dos elementos-traço nas penas**

As amostras de penas foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon 50 mL previamente pesados em balança de precisão de 0,01. O processo de limpeza das penas consistiu em três lavagens com acetona e um enxágue com água Milli-Q para eliminação da contaminação externa. A seguir secamos as amostras à  $50^{\circ}\text{C}$  por 96 h, pesamos novamente e submetemos à digestão pelo período de sete dias com ácido nítrico (65 %  $\text{HNO}_3$ , Suprapur Merck). Para cada grama de tecido seco utilizamos 2 mL de ácido nítrico para a digestão e 3 mL de água Milli-Q para a posterior diluição.

A concentração dos elementos-traço Cd, Pb, Cu e Zn nas penas foi determinada por espectrometria de absorção atômica de chama (AAS 932 Plus, GBC, Hampshire, IL, USA. Limite de detecção de Cd = 0,0004  $\mu\text{g/mL}$ ; Pb = 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; Cu = 0,001  $\mu\text{g/mL}$ ; Zn = 0,0005  $\mu\text{g/mL}$ . Amplitude de Cd de 0 a 1,8  $\mu\text{g/mL}$ ; Pb de 0,2 a 20  $\mu\text{g/mL}$ ; Cu de 0 a 5  $\mu\text{g/mL}$ ; Zn de 0 a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Expressamos as concentrações em  $\mu\text{g/g}$  de peso seco.

### **Análises bioquímicas**

Preparamos as amostras de tecido homogeneizando (1:5, v/v) com tampão TFK (20 mM, pH= 7,5) e a seguir centrifugando a  $10.000 \times g$  por 10 min. Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos pelo método de Buege e Aust (1978) e a produção de TBARS realizado por reação de malondialdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA). A determinação da PC foi realizada conforme o método de Yan et al. (1995) e o conteúdo de NPSH foi avaliado segundo o método de Ellman (1959). A determinação da atividade de SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com adrenalina de acordo com Misra e Fridovich (1972) e a atividade da CAT foi determinada como reportado por Nelson e Kiesow (1972). O conteúdo da proteína foi medido segundo o método de Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão. Todas as análises bioquímicas foram descritas em detalhes em Leitemperger et al. (2016).

### **Análise de dados**

Exploramos os dados através de Análises de Componentes Principais (PCA) e Análises de Correspondência Canônica (CCA) para verificar a existência de padrões gerais de concentração de elementos-traço e as medidas dos biomarcadores entre os sistemas de cultivo de arroz. Previamente centralizamos e padronizamos as concentrações de elementos-traço; padronizamos pelo máximo as medidas dos biomarcadores. Realizamos Teste T para verificar se as médias das concentrações de Cd, Pb, Cu e Zn em penas são diferentes entre os sistemas de cultivo de arroz. Testamos a hipótese de que existem diferenças de biomarcadores de estresse oxidativo entre os sistemas e que estas diferenças têm relação com a exposição aos elementos-traço através de modelos mistos lineares generalizados (GLMM; Bolker et al. 2009). O sexo, o sistema de cultivo e as concentrações de Cd, Pb, Cu e Zn em penas foram tratados como fatores fixos e as espécies como fatores aleatórios. Usamos o pacote base do programa R (R Core Team 2015) para realizar o teste T, o pacote Vegan

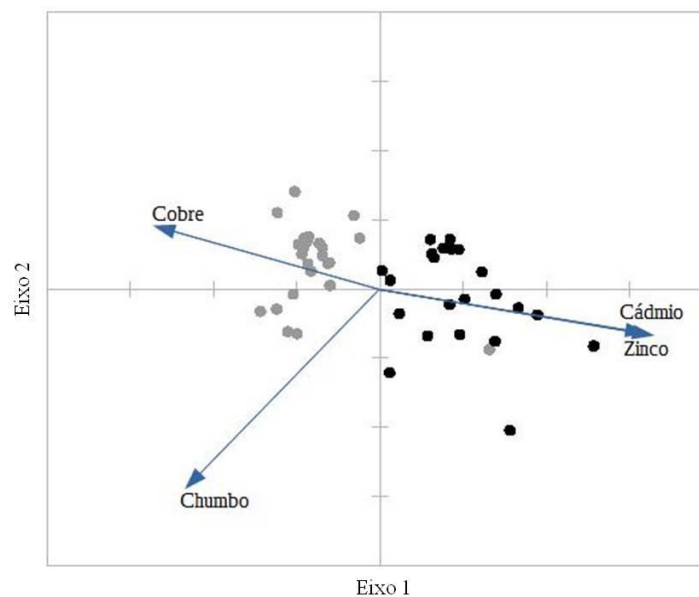


(Oksanen et al. 2016) para as análises multivariadas e a rotina *lmer* do pacote *lme4* (Bates et al. 2015) para a GLMM. Todas as análises estatísticas foram realizadas ao nível de significância em  $p < 0,05$ .

## Resultados

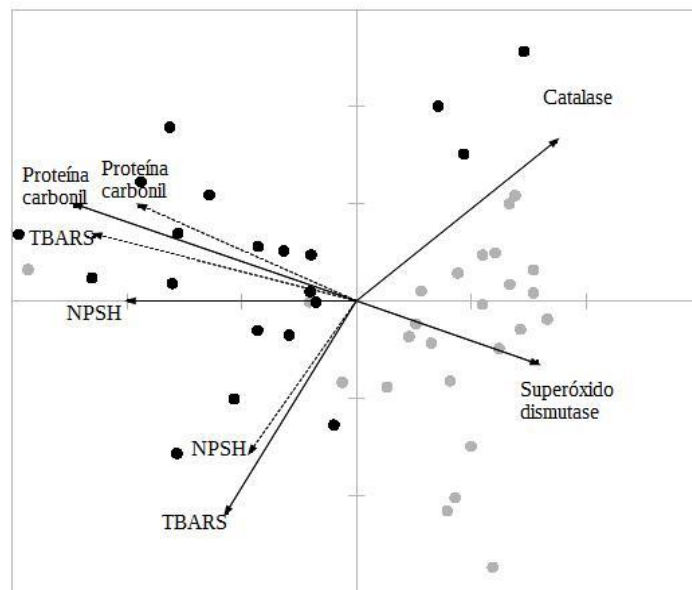
Ao todo foram coletados 49 espécimes adultos de aves aquáticas. No sistema de lavouras orgânico, foram coletados 24 espécimes das famílias Anatidae e Threskiornithidae, sendo sete *Amazonetta brasiliensis* (quatro machos e três fêmeas), dez *Dendrocygna viduata* (cinco machos e cinco fêmeas), um *Phimosus infuscatus* (macho) e seis *Plegadis chihi* (quatro machos e duas fêmeas). Já no sistema de lavouras não orgânico foram coletados mais 25 espécimes da família Anatidae, sendo 23 *D. viduata* (14 machos e nove fêmeas), uma *A. brasiliensis* (macho) e uma *Anas flavirostris* (macho).

Os dois primeiros eixos da ordenação da concentração de elementos-traço em penas explicaram cumulativamente 79,3 % das variações conjuntas dos quatro elementos e separaram nitidamente as aves que frequentam lavouras orgânicas, com maiores concentrações de Cd e Zn, das que frequentam lavouras não orgânicas, com concentrações maiores de Pb e Cu (Fig. 2).



**Fig 2.** Diagrama de ordenação ("biplot") das amostras ao longo do 1º (vertical) e do 2º eixo (horizontal) da Análise de Componentes Principais, gerado pela análise de cádmio, chumbo, cobre e zinco em sistemas de lavouras de arroz orgânico (círculos pretos) e não orgânico (círculos cinza).

A ordenação do perfil de biomarcadores também separou nitidamente as aves que frequentam os dois sistemas de cultivo. Os dois primeiros eixos desta ordenação explicaram cumulativamente 50,7 % das variações no perfil dos biomarcadores. Aves que frequentam lavouras orgânicas tem menor atividade da CAT e SOD, enquanto que as aves que frequentam lavouras não orgânicas têm menores níveis de NPSH, TBARS e PC (Fig. 3).



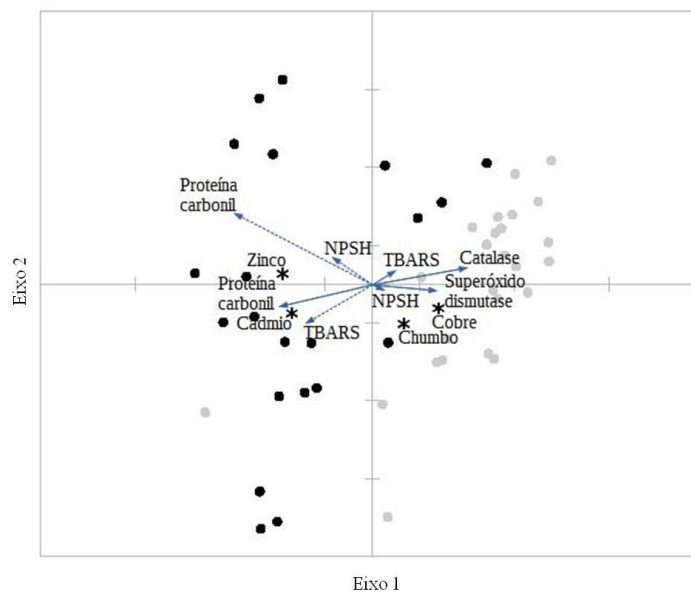
**Fig 3.** Diagrama de ordenação (“biplot”) das amostras ao longo do 1º (vertical) e do 2º eixo (horizontal) da Análise de Componentes Principais, gerado pela análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tíóis não proteicos (NPSH) e proteína carbonil em fígado (linha preenchida) e músculo (linha pontilhada) e na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fígado, em sistemas de lavouras de arroz orgânico (círculos pretos) e não orgânico (círculos cinza).

As concentrações médias de Cu ( $t= 4,95$ ,  $df= 41,862$ ,  $p= 1.27e-05$ ) e Pb ( $t= 3,46$ ,  $df= 32,407$ ,  $p= 0,001506$ ) nas penas de aves aquáticas foram mais elevadas nas lavouras não orgânicas, enquanto que as concentrações de Cd ( $t= -8,392$ ,  $df= 31,365$ ,  $p= 1.60e-09$ ) e Zn ( $t=-13,72$ ,  $df= 39,08$ ,  $p= 2.2 e-16$ ) foram mais elevadas nas lavouras orgânicas (Tabela 1). A ordenação direta (CCA) explicou nos dois primeiros eixos 26,0 % das variações de perfil de biomarcadores em função do perfil de concentrações de elementos-traço (Fig. 4), de um modo geral sugerindo o mesmo perfil de relações detectado nas ordenações indiretas, supondo um efeito pequeno nos níveis de TBARS e NPSH em fígado.

**Tabela 1.** Médias e desvios padrões respectivamente das concentrações de cádmio, chumbo, cobre e zinco medidos nas penas e dos biomarcadores de estresse oxidativo medidos no fígado (f) e/ou no músculo (m) das aves dos sistemas de lavouras de arroz irrigado orgânico e não orgânico.

Elementos-traço e biomarcadores medidos	Unidades	Sistemas de lavouras de arroz irrigado	
		Orgânica (N=24)	Não orgânica (N=25)
Cd	ug/g	0,383 ( $\pm$ 0,125)	0,149 ( $\pm$ 0,055)
Pb	ug/g	2,139 ( $\pm$ 1,142)	4,199 ( $\pm$ 2,733)
Cu	ug/g	5,223 ( $\pm$ 1,976)	7,672 ( $\pm$ 1,433)
Zn	ug/g	238,353( $\pm$ 33,799)	126,289 ( $\pm$ 21,814)
fTBARS	nmolMDA/mg proteína	1,997( $\pm$ 0,928)	1,791( $\pm$ 0,744)
mTBARS	nmolMDA/mg proteína	1,480( $\pm$ 2,771)	0,448( $\pm$ 0,331)
fNPSH	umolSH/g	0,468( $\pm$ 0,179)	0,356( $\pm$ 0,138)
mNPSH	umolSH/g	0,976( $\pm$ 1,173)	0,645( $\pm$ 0,184)
fPC	nmol carbonil/mg de proteína	15,701( $\pm$ 5,648)	4,781( $\pm$ 2,856)
mPC	nmol carbonil/mg de proteína	18,903( $\pm$ 12,894)	3,754( $\pm$ 1,499)
fSOD	UI SOD/mg proteína	4,970( $\pm$ 0,854)	5,857( $\pm$ 0,879)
fCAT	umol/mg proteína/min	0,627( $\pm$ 0,737)	0,810( $\pm$ 0,381)*

\*24 espécimes



**Fig 4.** Diagrama de ordenação (“biplot”) das amostras ao longo do 1º (vertical) e do 2º eixo (horizontal) Análise de Correspondência Canônica, gerado pela análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis não proteicos (NPSH) e proteína carbonil em fígado (linha preenchida) e músculo (linha pontilhada) e na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fígado e por cádmio, chumbo, cobre e zinco, em sistemas de lavouras de arroz orgânico (círculos pretos) e não orgânico (círculos cinza).

As aves aquáticas que frequentam lavouras de arroz orgânico e não orgânico apresentaram diferenças significativas no perfil de todos os biomarcadores analisados. Em dois destes casos houve relação entre a concentração de Pb nas penas e o perfil dos biomarcadores (TBARS e catalase).

Em fígado, quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de lavouras de arroz e concentração de Cd, o nível de PC foi significativamente maior nas lavouras de arroz orgânico (Tabela 2). Também quando ajustados pelos mesmos fatores, a atividade da enzima SOD foi maior nas lavouras de arroz não orgânico (Tabela 2). Quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de lavouras de arroz e concentração de Pb o nível de NPSH foi significativamente maior nas lavouras orgânicas (Tabela 2), o nível de PC foi significativamente maior nas lavouras orgânicas (Tabela 2) e a atividade da CAT foi significativamente maior nas não orgânicas (Tabela 2). Quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de lavouras de arroz e concentração de Cu, o nível da PC foi significativamente maior nas lavouras orgânicas (Tabela 2). Quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de lavouras de arroz e concentração de Zn, o nível de PC foi significativamente maior nas lavouras de arroz orgânico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Estimativa do efeito ( $\pm$ erro padrão) do sistema de lavoura de arroz irrigado e sexo em biomarcadores de estresse oxidativo medidos em fígado e sua interação com a concentração de elementos- traço nas penas de aves aquáticas.

Elementos-traço	Efeito	TBARS	NPSH	PC	SOD	CAT
Cd	Intercepto	1,20 $\pm$ 0,51	0,40 $\pm$ 0,10	4,48 $\pm$ 2,84	6,20 $\pm$ 0,54	0,88 $\pm$ 0,39
	Sexo masculino	0,32 $\pm$ 0,25	-0,03 $\pm$ 0,50	1,53 $\pm$ 1,32	0,03 $\pm$ 0,26	-0,03 $\pm$ 0,16
	Orgânico	1,00 $\pm$ 0,74	0,10 $\pm$ 0,14	9,65 $\pm$ 3,94*	-1,60 $\pm$ 0,78*	0,50 $\pm$ 0,48
	Cd ( $\mu$ g/g)	3,18 $\pm$ 3,07	-0,05 $\pm$ 0,60	0,88 $\pm$ 16,33	-2,48 $\pm$ 3,27	-1,57 $\pm$ 1,96
	Orgânico*Cd	-4,21 $\pm$ 3,35	0,00 $\pm$ 0,66	1,65 $\pm$ 17,84	3,40 $\pm$ 3,57	-0,13 $\pm$ 2,15
Pb	Intercepto	1,61 $\pm$ 0,35	0,32 $\pm$ 0,07	3,18 $\pm$ 2,17	5,74 $\pm$ 0,37	0,84 $\pm$ 0,28
	Sexo masculino	0,45 $\pm$ 0,25	-0,03 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 1,30	0,11 $\pm$ 0,27	-0,23 $\pm$ 0,16
	Orgânico	0,69 $\pm$ 0,48	0,20 $\pm$ 0,09*	10,67 $\pm$ 2,63**	-0,48 $\pm$ 0,52	-0,77 $\pm$ 0,31
	Pb ( $\mu$ g/g)	-0,02 $\pm$ 0,06	0,02 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,32	0,01 $\pm$ 0,06	-0,02 $\pm$ 0,04
	Orgânico*Pb	-0,24 $\pm$ 0,17	-0,03 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,88	-0,18 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,10**
Cu	Intercepto	0,40 $\pm$ 0,97	0,29 $\pm$ 0,19	2,26 $\pm$ 5,10	6,50 $\pm$ 1,04	1,49 $\pm$ 0,72
	Sexo masculino	0,34 $\pm$ 0,26	-0,03 $\pm$ 0,05	2,93 $\pm$ 1,31*	0,12 $\pm$ 0,28	-0,02 $\pm$ 0,18
	Orgânico	1,37 $\pm$ 1,07	0,15 $\pm$ 0,21	5,56 $\pm$ 5,40	-2,09 $\pm$ 1,14	-1,07 $\pm$ 0,76
	Cu ( $\mu$ g/g)	0,16 $\pm$ 0,12	0,01 $\pm$ 0,023	0,35 $\pm$ 0,59	-0,08 $\pm$ 0,12	-0,10 $\pm$ 0,08
	Orgânico*Cu	-0,16 $\pm$ 0,15	-0,00 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,76	0,18 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,11
Zn	Intercepto	1,73 $\pm$ 0,97	0,38 $\pm$ 0,20	5,80 $\pm$ 5,44	7,59 $\pm$ 1,06	1,26 $\pm$ 0,73
	Sexo masculino	0,29 $\pm$ 0,23	-0,04 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 1,25	0,03 $\pm$ 0,25	-0,09 $\pm$ 0,16
	Orgânico	-2,88 $\pm$ 1,52	0,43 $\pm$ 0,31	21,35 $\pm$ 8,33*	-1,03 $\pm$ 1,65	-0,96 $\pm$ 1,09
	Zn ( $\mu$ g/g)	-0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,04	-0,01 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,00
	Orgânico*Zn	0,01 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,00	-0,04 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01

Em músculo, quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de cultivo de arroz e concentração de Cd, o nível de PC foi significativamente maior no sistema de cultivo de arroz orgânico (Tabela 3). Quando ajustados pelo sexo, diferenças entre sistemas de cultivo de arroz e concentração de Pb, tanto o nível de TBARS, quanto de PC foram significativamente maiores no sistema de cultivo orgânico (Tabela 3).

**Tabela 3.** Estimativa do efeito ( $\pm$ erro padrão) do sistema de lavoura de arroz irrigado e sexo em biomarcadores de estresse oxidativo medidos em músculo e sua interação com a concentração de elementos- traço nas penas de aves aquáticas.

Elementos-traço	Efeito	TBARS	NPSH	PC
Cd	Intercepto	0,57 $\pm$ 0,34	0,83 $\pm$ 0,53	1,52 $\pm$ 0,34
	Sexo masculino	0,02 $\pm$ 0,11	0,23 $\pm$ 0,25	0,02 $\pm$ 0,15
	Orgânico	0,22 $\pm$ 0,34	-0,25 $\pm$ 0,74	1,96 $\pm$ 0,44**
	Cd ( $\mu$ g/g)	0,46 $\pm$ 1,36	-1,11 $\pm$ 3,06	-0,45 $\pm$ 1,82
	Orgânico*Cd	0,10 $\pm$ 1,50	1,83 $\pm$ 3,34	-1,34 $\pm$ 1,99
Pb	Intercepto	0,43 $\pm$ 0,31	0,81 $\pm$ 0,40	8,24 $\pm$ 4,89
	Sexo masculino	0,02 $\pm$ 0,11	0,25 $\pm$ 0,25	-0,36 $\pm$ 2,63
	Orgânico	0,56 $\pm$ 0,23*	0,08 $\pm$ 0,50	12,37 $\pm$ 5,40*
	Pb ( $\mu$ g/g)	0,06 $\pm$ 0,03*	-0,04 $\pm$ 0,06	-0,04 $\pm$ 0,64
	Orgânico*Pb	-0,04 $\pm$ 0,08	0,02 $\pm$ 0,17	-0,66 $\pm$ 1,79
Cu	Intercepto	0,29 $\pm$ 0,56	0,94 $\pm$ 0,92	11,00 $\pm$ 10,78
	Sexo masculino	0,03 $\pm$ 0,12	-0,00 $\pm$ 0,25	-1,69 $\pm$ 2,76
	Orgânico	0,72 $\pm$ 0,50	1,20 $\pm$ 1,01	13,74 $\pm$ 11,42
	Cu ( $\mu$ g/g)	0,04 $\pm$ 0,05	-0,03 $\pm$ 0,11	-0,35 $\pm$ 1,26
	Orgânico*Cu	0,05 $\pm$ 0,70	-0,19 $\pm$ 0,14	-0,60 $\pm$ 1,60
Zn	Intercepto	0,44 $\pm$ 0,56	0,74 $\pm$ 1,04	1,68 $\pm$ 0,67
	Sexo masculino	0,03 $\pm$ 0,11	0,24 $\pm$ 0,24	-0,03 $\pm$ 0,15
	Orgânico	0,68 $\pm$ 0,74	0,13 $\pm$ 1,62	1,05 $\pm$ 1,02
	Zn ( $\mu$ g/g)	0,00 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,00
	Orgânico*Zn	-0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

## Discussão

Nosso estudo sugere que aves aquáticas que frequentam lavouras de arroz apresentam diferenças quanto à exposição a elementos-traço e diferenças no seu perfil de biomarcadores. Entretanto, não verificamos uma associação consistente entre a exposição e os efeitos bioquímicos. Isto pode ser explicado, pois biomarcadores de estresse oxidativo não são específicos à exposição de metais, tais como ALAD para Pb, metalotioneínas para Cu, Zn, Ag, Cd e Hg (Koivula e Eeva 2010; Lucia et al. 2012; Espin et al. 2015) ou ceruloplasmina para Cu (Halliwell e Gutteridge 2006). Contudo, eles permitem indicar o contato inicial com elementos-traço e possíveis malefícios para a saúde dos animais (van der Oost et al. 2003).

As maiores concentrações de Cd e Zn no sistema orgânico e as maiores concentrações de Pb e Cu no sistema não-orgânico podem ser explicadas pela possível utilização de fertilizantes inorgânicos fosfatados, os quais podem ser à base de Cu ou Zn (dependendo da necessidade do solo para o crescimento e ciclo de vida adequado da planta). Além disto, compostos usados para suplementação podem conter elementos-traço, como impurezas, tais com Cd e Pb. Estes fertilizantes após cumprirem a sua função, podem se acumular no ambiente e assim contaminar as aves (Nicholson et al. 2003; Wuana e Okieimen 2011). Outra hipótese é que esta concentração seja aumentada devido ao uso de estrume de animais como fertilizante, o que também pode levar a acumulação de elementos-traço, como Cd, Cu, Pb e Zn no ambiente, devido a dieta destes animais (Nicholson et al. 2003; Wuana e Okieimen 2011). Além do uso de agrotóxicos (no caso do sistema não-orgânico) que possam conter, por exemplo, Cu (Nicholson et al. 2003). Derivados de petróleo (óleos combustíveis e/ou óleos lubrificantes), os quais podem estar presentes no efluente de onde é retirada a água de irrigação para as lavouras, também podem influenciar na concentração de Pb (Lushchak 2011).

Fatores não analisados neste estudo podem ter influenciado nossos resultados, por exemplo, a interação dos elementos-traço com outros elementos: os macroelementos (Na, K, Ca, Mg e Fe). Para *Ciconia ciconia* a interação dos macro e microelementos Fe-Cd é que mostrou-se diretamente relacionada com a atividade de SOD (Kaminski et al. 2009b). Outro exemplo é a interação entre os biomarcadores medidos; para *Anas platyrhynchos*, *Aythya ferina*, *Fulica atra* e *Gallinula chloropus* o processo de defesa contra o estresse oxidativo causado pelos elementos-traço iniciou-se com os biomarcadores antioxidantes enzimáticos, tais como SOD e CAT (Martinez-Haro et al. 2011), o que pode ter levado a uma detecção mais baixa de NPSH e PC no nosso estudo. Ou então a interação dos biomarcadores com outros biomarcadores antioxidantes não enzimáticos (Vitamina E), os quais podem ter atuado prevenindo a formação de, por exemplo, TBARS (Mateo et al. 2003; Martinez-Haro et al. 2011). Ou até mesmo devido à interação com metalotioneínas que atuam no processo de detoxificação de aves com altas concentrações de elementos-traço e também previnem a formação de TBARS (Lucia et al. 2012b).

Outros fatores não controlados em nosso estudo podem ter influenciado os resultados encontrados, tais como o ritmo circadiano, a temperatura ambiental e a presença de infecções parasitárias (Dawson e Bortolotii 1997a, b; Kaminski et al. 2013). Fatores como dieta e estado nutricional também podem influenciar os resultados. O estado nutricional e o acesso a uma dieta que permita fornecer antioxidantes para a população de aves indica que certos habitats possuem condições pobres de nutrição. Isto aumenta o estresse oxidativo e estas aves requerem mais mecanismos de defesa para combatê-lo (Koivula e Eeva 2010).

Não foi possível analisar aves abatidas num mesmo ano em sistemas de lavouras de arroz orgânico e não orgânico, entretanto, entre os anos estudados, não houve diferença no modo de cultivo em cada sistema de

lavouras. Também não houve diferença climática que pudesse justificar os padrões consistentes de variação no perfil de exposição a elementos-traço e de perfil de biomarcadores. Neste estudo, comparamos apenas um sistema de lavouras para cada modo de cultivo. Ainda assim, consideramos que as lavouras estudadas são representativas de cada modo de cultivo. Além disso, os solos, as águas e o embasamento geológico das regiões de produção de arroz irrigado no sul do Brasil não apresentam naturalmente concentrações significativas ou variações importantes nas concentrações dos elementos-traço (Província geomorfológica/geológica denominada de Sedimentos inconsolidados da Planície Costeira: Cd= 0,36 mg/kg, Pb= 27 mg/Kg, Cu= 37 mg/Kg e Zn= 33 mg/kg (Althaus et al. 2013; FEPAM 2014).

Pesticidas também podem induzir estresse oxidativo por diversas vias: a) entrando no ciclo de reações de redução-oxidação; b) pelo metabolismo celular; c) inativando enzimas antioxidantes; d) modificando processos vitais de transcrição e tradução, o que pode aumentar indiretamente as reações de redução-oxidação (Lushchak 2011).

As concentrações de elementos-traço que encontramos nas penas das aves estudadas variaram entorno dos limiares conhecidos para provocar efeitos bioquímicos em aves. Em *Calidris canutus* foram registradas médias de 0,03 ug/g de Cd, 0,77 ug/g de Pb, 19,3 ug/g de Cu e 174 ug/g de Zn (Lucia et al. 2012a); *Limosa limosa* foram observadas médias de 0,02 ug/g de Cd, 1,13 ug/g de Pb, 19 ug/g de Cu e 160 ug/g de Zn (Lucia et al. 2012b); *Fulica atra* foram registradas médias de 0,69 ug/g de Cd, 1,95 ug/g de Pb, 7,57 ug/g de Cu e 25,76 ug/g de Zn; *Anas platyrhynchos* foram observadas médias de 0,71 ug/g de Cd, 1,45 ug/g de Pb, 6,28 ug/g de Cu e 24,77 ug/g de Zn (Mansouri e Majnoni 2014); *Bubulcus ibis* foram verificadas médias de 41 ug/g de Cd, 297 ug/g de Pb, 62,7 ug/g de Cu e de 529 ug/g de Zn (Abdullah et al. 2015). Suspeitamos que a exposição crônica evidenciada nas penas possa ser insuficiente, no caso estudado, para provocar situações agudas de níveis críticos capazes de alterar de forma importante o perfil dos biomarcadores.

Os sistemas de produção agrícola de arroz irrigado podem exercer diferentes efeitos sobre as comunidades de aves aquáticas, incluindo diferenças na estrutura da paisagem, disponibilidade de recursos alimentares, refúgio e exposição a contaminantes (King et al. 2010; Stafford et al. 2010; Elphick 2010). Insumos químicos podem ser fontes de exposição das aves aquáticas a elementos-traço. Nosso estudo demonstra que existem diferenças de exposição a elementos-traço e de perfil de biomarcadores, mesmo que não estejam claramente associados, o que justifica a relevância de se observar melhores práticas de produção agrícola não somente de arroz, mas também de outros grãos. Consideramos que nossos resultados ilustram um caso representativo da situação encontrada nos cultivos de arroz no sul do Brasil até que estudos de maior duração estejam disponíveis.

## **Conclusão**

As aves aquáticas que utilizam lavouras de arroz demonstram diferenças quanto à exposição a elementos-traço e diferenças no seu perfil de biomarcadores, mesmo que ainda não estejam claramente associados. Desta forma, consideramos que nossos resultados sejam representativos da situação encontrada nos cultivos de arroz no sul do Brasil até que estudos de maior duração estejam disponíveis. E com isto, nossos resultados justificam a importância de se observar melhores práticas de produção agrícola.



## Referências

- Abdullah M et al (2015) Avian feathers as a non-destructive bio-monitoring tool of trace metals signatures: A case study from severely contaminated areas. *Chemosphere* 119: 553-561
- Althaus D et al (2013). Teores naturais de metais pesados em solos do Estado do Rio Grande do Sul. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Anais, Florianópolis, pp 1-4
- Ancora S et al (2008) Heavy metals in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) from Italian wetlands: The problem of ingestion of lead shot. *Environ Res* 107(2):229-236
- Andreani G et al (2008) Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci Total Environ* 390(1):287-294
- Bates D et al (2015) *\_lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4\_*. R package version 1.1-8. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>. Acessado 02 maio 2016
- Bolker, BM et al (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 24(3) 127-135
- Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248-254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-309
- Burger J (1993) Metals in avian feathers: bioindicators of environmental pollution. *Rev Environ Toxicol* 5:203-311
- Custer TW (2000) Mixed-Function oxygenases, oxidative stress, and chromosomal damage measured in Lesser scaup wintering on the Indiana Harbor Canal. *Arch Environ Contam Toxicol* 38(4):522-529
- Dauwe T et al (2003) The effect of heavy metal exposure on egg size, egg shell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs. *Environ Pollut* 129(1):125-129
- Dalle-Donne I et al. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1):23-38
- Dawson RD, Bortolotti GR (1997a) Variation in hematocrit and total plasma proteins of nestling American kestrels (*Falco sparverius*) in the wild. *Comp Biochem Physiol* 117A(3):383-390

- Dawson RD, Bortolotti GR (1997b) Are avian hematocrits indicative of condition? American kestrels as a model. *J Wildl Manage* 61(4):1297-1306
- de la Casa-Resino I et al (2015) Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol Environ Chem* 97(5):588-598
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1), 47-95
- Eisler R (1985) Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. United States Fish and Wildlife Service Biological Report, No. 85(1.2). Laurel, Maryland
- Eisler R (1988) Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. United States Fish and Wildlife Service Biological Report, No. 85(1.14). Laurel, Maryland
- Eisler R (1993) Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. United States Fish and Wildlife Service Biological Report, No. 10. Laurel, Maryland
- Eisler R (1998) Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. United States Fish and Wildlife Service Biological Report, No. 33. Laurel, Maryland
- Eisler R (2000) Handbook of chemical risk assessment: Health hazards to humans, plants, and animals, Volume 1, Chromium. Lewis Publishers, Boca Raton
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem* 82(1):70-77
- Elphick CS (2010) Why study birds in rice fields? *Waterbirds*, 33(sp1):1-7
- Espin S et al (2015) Delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ ALAD) activity in four free-living bird species exposed to different levels of lead under natural conditions. *Environ Res* 137:185-198
- FEPAM (2014) Fundação Estadual de Proteção ao Meio Ambiente. Portaria N.º 85/2014
- Furness RW (1996) Cadmium in birds. In: Beyer WN, Heinz GH, Redmond-Norwood AW (eds) *Environmental contaminants in wildlife, interpreting tissue concentrations*. Lewis Publishers, New York, pp 389-404
- Gimeno-García E, Andreu V, Boluda R (1996) Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ Pollut* 92(1):19-25
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radical in Biology and Medicine*, 4 ed. Oxford University Press, Oxford

Heath AG (1995) Water pollution and fish physiology, 2 ed. Lewis Publishers, Florida

IBGE (2012) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Biomas. [ftp://geofpt.ibge.gov.br/mapas\\_tematicos/mapas\\_murais/biomas.pdf](ftp://geofpt.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf). Acessado 02 maio 2016

Janssens E et al (2003) Effects of heavy metal exposure on the condition and health of nestlings of the great tit (*Parus major*), a small songbird species. *Environ Pollut* 126(2):267-274

Kaminski P et al (2009a) Ecophysiological determinations of antioxidant enzymes and lipoperoxidation in the blood of White Stork *Ciconia ciconia* from Poland. *Environ Res* 109(1):29-39

Kaminski P et al (2009b) The impact of element-element interactions on antioxidant enzymatic activity in the blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) chicks. *Arch Environ Contam Toxicol* 56(2):325-337

Kaminski P et al (2013) Sex and other sources of variation in the haematological parameters of White Stork *Ciconia ciconia* chicks. *J Ornithol* 155(1):307-314

King S et al (2010) Effects of landscape features on waterbird use of rice fields. *Waterbirds* 33(sp1):151-159

Klaassen DC, Watkins BJ (2012) Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull, 2. ed. AMGH, Porto Alegre

Koivula MJ, Eeva T (2010) Metal-related oxidative stress in birds. *Environ Pollut* 158(7):2359-2370

Leitemperger J et al. (2016) Early biochemical biomarkers for zinc in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after acute exposure. *Fish Physiol Biochem*. doi: 10.1007/s10695-015-0192-0

Lewis SA, Furness RW (1991) Mercury accumulation and excretion by laboratory reared black-headed gull (*Larus ridibundus*) chicks. *Arch Environ Contam Toxicol* 21(2):316-320

Lucia M et al (2010) Trace Element Concentrations (Mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the southwest Atlantic coast of France. *Arch Environ Contam Toxicol* 58(3):844-853

Lucia M et al (2012a) Evidence of species-specific detoxification processes for trace elements in shorebirds. *Ecotoxicology* 21(8):2349-2362

Lucia M et al (2012b) Insight on trace element detoxification in the Black-tailed godwit (*Limosa limosa*) through genetic, enzymatic and metallothionein analyses. *Sci Total Environ* 15(423):73-83

Lushchak VI (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101(7):13-30

- Maluf JRT (2000). Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *RBAgro* 8(1):141-150
- Mansouri B, Majnoni F (2014) Comparison of the Metal Concentrations in Organs of Two Bird Species from Western of Iran. *Bull Environ Contam Toxicol* 92(4):433-439
- Martin MB et al (2003) Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144(6):2425-2436
- Martinez-Haro, M et al 2011. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. *Environ Res* 111(4):530-538
- Mateo R et al (2003) Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J Toxicol Environ Health Part A* 66(14):1371-1389
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10):3170-3175
- Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Anal Biochem* 49(2):474-478
- Nicholson FA et al (2003) An Inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci Total Environ* 311(1-3):205-219
- Oksanen J et al (2016) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acessado 02 maio 2016
- R Core Team (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. Acessado 02 maio 2016
- Rattner B (2009) History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18(7):773-783
- Reischl E et al (2007) Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(1-2):22-53
- Rodgher S et al (2005) Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê river (São Paulo, Brazil). *Braz J Biol* 65(4):697-719
- Sacco AN, Bergmann FB, Rui AM (2013) Assembleia de aves na área urbana do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop* 13(2):153-162

Stafford JD et al (2010) Avian foods, foraging and habitat conservation in world rice fields. *Waterbirds* 33(sp1):133-150

Takekawa JY et al (2002) Relating body condition to inorganic contaminant concentrations of diving ducks wintering in coastal California. *Arch Environ Contam Toxicol* 42(1):60-70

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13(2):57-149

Wuana RA, Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Int Sch Res Notices* doi:10.5402/2011/402647

Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228(2):349-351

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que a contaminação por Pb pode estar associada significativamente com alterações bioquímicas em aves aquáticas. As aves aquáticas expostas às áreas contaminadas por Pb quando comparadas com aves não expostas, tendem a apresentar uma maior atividade de CAT uma menor atividade de ALAD, CP e GR; um maior nível de PROTO e de Pb na corrente sanguínea; um menor nível de HEMAT e de HEMO. Além disto, o nível de Pb nos rins de aves aquáticas aumenta gradualmente conforme o aumento da concentração de Pb no ambiente.

De acordo com nosso estudo fica evidente que aves aquáticas de vida livre expostas à contaminação por Pb em ambientes aquáticos apresentam diversas alterações bioquímicas quando comparadas com as expostas às áreas de referência, ou seja, não contaminadas por Pb. O tamanho do efeito, por outro lado, não pode ser inferido somente à contaminação de Pb no ambiente devido a existência de outros fatores confundidores que não foram analisados.

Diante destes resultados, recomendamos o desenvolvimento de um protocolo padrão para a quantificação das alterações bioquímicas causadas pela contaminação por Pb em aves aquáticas de vida livre, o qual sirva para avaliar situações tanto de contaminação crônica quanto aguda. Deve ser incluído no protocolo os procedimentos adequados de campo e de laboratório, o conjunto de biomarcadores a serem analisados, a estatística a ser testada e a identificação de fatores confundidores.

Até então, aconselhamos quantificar diversos biomarcadores em vez de somente um para inferir que certa concentração de Pb em ambientes aquáticos é responsável por provocar alterações bioquímicas em aves aquáticas. Além disto, incluir no estudo diferentes espécies, estratificar e resumir os dados para entender a influência de fatores confundidores.

Também demonstramos neste estudo que as aves aquáticas que frequentam diferentes sistemas de lavouras de arroz apresentam diferenças quanto à exposição aos elementos-traço e quanto ao seu perfil de biomarcadores. A concentração de Cd e Zn foi maior nas penas das aves do sistema de lavouras orgânicas enquanto que a concentração de Pb e Cu foi maior nas penas das aves do sistema não-orgânico. Já as medidas de TBARS, NPSH e PC foram maiores no sistema de lavouras orgânicas e as medidas de SOD e CAT foram maiores no sistema não-orgânico. Entretanto, não verificamos uma associação consistente entre a exposição e os efeitos bioquímicos.

Os sistemas de produção agrícola de arroz irrigado podem exercer diferentes efeitos sobre as comunidades de aves aquáticas, incluindo diferenças na estrutura da paisagem,

disponibilidade de recursos alimentares, refúgio e exposição a contaminantes (ELPHICK, 2010; KING et al., 2010; STAFFORD et al., 2010). Diversas são as fontes que podem dar origem aos elementos-traço em um sistema de lavouras (NICHOLSON et al., 2003; WUANA e OKIEIMEN, 2011). Nosso estudo demonstra que existem diferenças de exposição aos elementos-traço e ao perfil de biomarcadores, mesmo que não estejam claramente associados, o que justifica a relevância de se observar melhores práticas de produção agrícola não somente de arroz, mas também de outros grãos.

Desta forma, consideramos que nossos resultados ilustram um caso representativo da situação encontrada nos cultivos de arroz no sul do Brasil até que estudos de maior duração estejam disponíveis.

## 5 CONCLUSÃO

- Existem alterações bioquímicas em decorrência da exposição das aves às áreas contaminadas, porém os biomarcadores são influenciados por diversos fatores ainda não bem estudados;
- Sugerimos a proposição de um protocolo de medição de alterações bioquímicas para estudos de campo;
- Aconselhamos a utilização de vários biomarcadores e não somente um para a detecção da exposição das aves à contaminação por Pb, por exemplo: ALAD, hemoglobina, hematócitos e protoporfirinas.
- As aves aquáticas que utilizam lavouras de arroz demonstram diferenças quanto à exposição a elementos-traço e diferenças no seu perfil de biomarcadores, mesmo que esta relação não esteja claramente associada;
- Consideramos importante observar melhores práticas de produção agrícola.



## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. R.; NOVAES, A. C; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p.1145-1154, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000700015.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7
- ANCORA, S. et al. Heavy metals in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) from Italian wetlands: The problem of ingestion of lead shot. **Environmental Research**, v. 107, n. 2, p. 229-236, 2008. DOI: 10.1016/j.envres.2008.02.004.
- ANDREANI, G. et al. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. **Science of the Total Environment**, v. 390, n. 1, p. 287-294, 2008. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.09.014.
- ARNQVIST, G.; WOOSTER, D. Meta-analysis: synthesizing research findings in ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 6. 236-240, 1995. DOI: :10.1016/S0169-5347(00)89073-4.
- BAOS, R. et al. Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling White Storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 10, p. 1497-1501, 2006. DOI: doi: 10.1289/ehp.9099.
- BARBOSA, K. B. F. et al. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BINKOWSKI, L. J.; STAWARZ, R. M.; ZAKREWSKI, M. Concentrations of cadmium, copper and zinc in tissues of mallard and coot from southern Poland. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 48, n. 5, p. 410-415, 2013. DOI: doi: 10.1080/03601234.2013.742725.
- BITTO, E. et al. Structure of pyrimidine 5'-nucleotidase type 1: insight into mechanism of action and inhibition during lead poisoning. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 281, n. 29, p. 20521-20529, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M602000200.
- BORENSTEIN, M.; HEDGES L. V.; HIGGINS J. P. T.; ROTHSTEIN H. R. 1 ed. **Introduction to meta-analysis**. West Sussex: Wiley, 2009. 452 p.
- BRASIL. Lei 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e

embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Palácio do Planalto Presidência da República. Legislação.** Disponível em: < <http://www2.planalto.gov.br/acervo/legislacao>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

BROADLEY M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x.

BRYCE-SMITH, D. Zinc deficiency - the neglected factor. **Chemistry in Britain**, v. 25, p. 783-786, 1989.

CADET, J. et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutacion Research**, v. 8, n. 424(1-2), p. 9-21, 1999. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00004-4

CENTRE FOR EVIDENCE-BASED CONSERVATION. 2016. **Centre for Evidence-Based Conservation.** <<http://www.cebc.bangor.ac.uk>> Acesso em 23 mar. 2016.

CID, F. D. et al. Contamination of heavy metals in birds from Embalse La Florida (San Luis, Argentina). **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 11, p. 2044-2051, 2009. DOI: 10.1039/b906227k.

CHATGILIALOGLU C; O'NEILL P. Free radicals associated with DNA damage. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1459-1471, 2001. DOI: 10.1016/S0531-5565(01)00132-2.

COLIN, B.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspect**, v. 74, p. 3 - 9, 1987.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 2, Safra 2014/15, n. 4. Quarto levantamento. Brasília: Conab. 2015.

CÔTE, I. M. et al. Measuring coral reef decline through meta-analyses. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**. v. 28, n. 360, p. 385-395, 2005. DOI: 10.1098/rstb.2004.1591.

DAL MOLIN, F.; PAOLIELLO, M. M. B.; CAPITANI, E. M. A zincoprotoporfirina como indicador biológico de exposição ao chumbo: uma revisão. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 19, n. 2, p. 71-80, 2006.

DALLE-DONE. I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997. DOI: 10.1016/S0269-7491(97)00110-3.

- DAUWE, T. et al. Tissue levels of lead in experimentally exposed zebra finches (*Taeniopygia guttata*) with particular attention on the use of feathers as biomonitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 88-92, 2002. DOI: 10.1007/s002440010295.
- DIAS, R.; BURGER, M. I. A assembleia de aves de áreas úmidas em dois sistemas de cultivo de arroz irrigado no extremo sul do Brasil. **Ararajuba**, v. 13, n. 1, p. 63-80, 2005.
- DONALD, P. F. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. **Conservation Biology**, v. 18, n. 1, p. 17-37, 2004. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2004.01803.x
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n. 1, p. 47-95, 2002. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
- ELPHICK, C. S. Functional equivalency between rice fields and seminatural wetland habitats. **Conservation Biology**, v. 14, n. 1, p. 181-191, 2000. DOI: 10.1046/j.1523-1739.2000.98314.x.
- ELPHICK, C. S. Why study birds in Rice fields? **Waterbirds**, v. 33, n. sp1, p. 1-7, 2010. DOI: 10.1675/063.033.s101.
- EISLER, R. **Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. United States Fish and Wildlife Service Biological Report No. 85(1.2). United States Fish and Wildlife Service, Washington, DC. 1985.
- EISLER, R. **Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. United States Fish and Wildlife Service Biological Report No. 1997-0002. United States Fish and Wildlife Service, Washington, DC. 1998.
- EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil**. PEREIRA, D. P.; BANDEIRA, D. L.; QUINCOZES, E. R. F. (Eds.). Sistemas de Produção, 3. ISSN 1806-9207. Versão Eletrônica. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/index.htm>> Acesso em: 25 nov. 2015.
- ESTEVES, F. A. (Coord.). **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 826 p.
- FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division**. 2015. Disponível em:<<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 24 mar. 2016.
- FASOLA, M.; X. RUÍZ. Rice farming and waterbirds: integrated management in an artificial landscape. In: PAIN, D.; PIENKOWKI, M. W. (Eds.). **Farming and Birds in Europe**. London: Academic Press, 1997. p. 210-235.
- FEDYNICH, A. M. et al. Arsenic, cadmium, copper, lead, and selenium in migrating Blue-Winged Teal (*Anas discors* L.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 4, p. 662-666, 2007. DOI: 10.1007/s00244-006-0119-y.

FERREIRA, A. L. A. E MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. DOI: 10.1590/S0104-42301997000100014.

FURNESS, R. W. Cadmium in birds. In: BEYER, W. N.; HEINZ, G. H.; REDMON-NORWOOD, A. W. (Eds.). **Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 389-404.

GILL, F.; DONSKER, D. (Eds.). 2016. IOC World Bird List (v 6.1). DOI: 10.14344/IOC.ML.6.1.

GLASS, G. V. Primary, secondary, and metaanalysis of research. **Educational Researcher**, v. 5, n. 10, p. 3-8, 1976. DOI: 10.3102/0013189X005010003.

GOODYEAR-BRUCH, C.; PIERCE, J. D. Oxidative stress in critically ill patients. **American Journal of Critical Care**, v. 11, n.(6), p. 543-551, 2002.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v. 15, n. 443(1-2), p. 37-52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Oxford University Press, 2006. 851 p.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Florida: Lewis Publishers, 1995. 644 p.

HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. 2011. **Cochrane handbook for systematic reviews of interventions**. Version 5.1.0. The Cochrane Collaboration. Disponível em: <<http://www.cochrane-handbook.org>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

KAMUNDE, C. N.; WOOD, C. M. Environmental chemistry, physiological homeostasis, toxicology, and environmental regulation of copper, an essential element in freshwater fish. **Australian Journal of Ecotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2004.

KELADA, S. N. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. **American Journal of Epidemiology**. v. 154, n. 1, p. 1-13, 2001. DOI: 10.1093/aje/154.1.1.

KIEKENS, L. Zinc. In: ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, 1990. p. 261-79.

KIM, J.; LEE, D. P.; KOO, T. H. Effects of age on heavy metal concentrations of Black-crowned night herons *Nycticorax nycticorax* from Korea. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 3, p. 600-607, 2010. DOI: 10.1039/b911598f. .

KIM, J.; OH, J. Lead and cadmium contaminations in feathers of heron and egret chicks. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 4, p. 2321-2327, 2014. DOI: 10.1007/s10661-013-3540-5.

KING, S. et al. Effects of landscape features on waterbird use of rice fields. **Waterbirds**, v. 33(sp1), p. 151-159, 2010. DOI: 10.1675/063.033.s111.

KLAASSEN, D. C.; WATKINS, B. J. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 460 p.

LAWLER, S. P. Rice fields as temporary wetlands: a review. **Israel Journal of Zoology**, v. 47, n. 4, p. 513-528, 2001. DOI: 10.1092/X7K3-9JG8-MH2J-XGX1.

LEJEUNE, K. et al. **Report of Injury Assessment and Injury Determination: Coeur d'Alene Basin Natural Resource Damage Assessment**. U.S. Fish and Wildlife Service, U.S. Forest Service, and the Coeur d'Alene Tribe, Stratus Consulting, Inc. (Stratus), 2000.

LESTER, J. N. **Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes**. Florida: CRC Press, 1987. 195 p.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009. DOI: 10.1016/j.mam.2008.05.005.

MARTIN, M. B. et al. Estrogen-like activity of metals in Mcf-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, Washington, v. 144, n. 6, p. 2425-2436, 2003. DOI: 10.1210/en.2002-221054.

MEDEIROS, M. A. Zinco. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 159-160, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Arroz**. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acesso em: 25 nov. 2015.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters**. New York: Springer-Verlag, 1984. 328 p.

NAM, D. H.; LEE, D. P. Monitoring for Pb and Cd pollution using feral pigeons in rural, urban, and industrial environments of Korea. **Science of Total Environment**, v. 357, n. 1-3, p. 288-295, 2006. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2005.08.017.

NICHOLSON, F. A. et al. An Inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. **Science of the Total Environment**, v. 311, n. 1-3, p. 205-219, 2003. DOI: 10.1016/S0048-9697(03)00139-6.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. **Cadmium review**. v. 1, n. 4, 2003. 29 p.

PAIN, D. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CARNIS, J. Jr. (Eds.). **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. p. 356-391.

PAIN, D. J. Lead in waterfowl. In: BEYER, W. N.; HEINZ, G. H.; REDMON- NORWOOD, A. W. (Eds.). **Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 251-264.

PASSOS, F. R.; REIS, M. R. Resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: Revisão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 23, n. jan/dez. p. 49-58, 2013. DOI: 10.5380/PES.V23i0.35002.

PATTEE, O. H.; PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G.A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. **Handbook of Ecotoxicology**, 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 37-408.

PEAKALL, D. W.; WALKER, C. H. The role of biomarkers in environmental assessment. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 173-179, 1994. DOI: 10.1007/BF00117082.

PIERCE, J. D. et al. Why should you care about free radicals? **RN**, v. 67, n. 1, p. 38-42, 2004.

PIERLUISSI, S. Breeding Waterbirds in Rice Fields: A Global Review. **Waterbirds**, v. 33, n. sp1, p. 123-132. 2010. DOI: 10.1675/063.033.s109.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 313 p.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal Clinical of Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-44, 2007.

RATTNER, B. A. et al. Concentrations of metals in blood and feathers of nesting ospreys (*Pandion haliaetus*) in Chesapeake and Delaware Bays. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 114–122, 2008. DOI: 10.1007/s00244-007-9004-6.

RATTNER, B. A. History of wildlife toxicology. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 7, p. 773-783, 2009. DOI: 10.1007/s10646-009-0354-x.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R. **Fungicidas: aspectos gerais**. Revista Plantio Direto, Passo Fundo, ed. 97, jan./fev. 2007. Disponível em: <[http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont\\_int&id=777](http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=777)>. Acesso em: 25 nov. 2015.

REPETTO, M. SANZ, P. (Autores). **Glosario de terminos toxicologicos. Asociacion Española de Toxicologia**. 1995. Disponível em: <<http://busca-tox.com/05pub/Glosario%20terminos%20toxicologicos%20toxicologia%20Repetto.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

RODGHER, S. et al. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê river (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 65, n. 4, p. 697-719, 2005. DOI : 10.1590/S1519-69842005000400017 .

SANCHES, M. S. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, n. jan/dez, p. 53-58, 2003. DOI: 10.5380/pes.v13i0.3165.

SANTOS, G. C. G. D. **Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico**. 2005. 153 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SAVINOV, V. M.; GABRIELSEN, G. W.; SAVINOV, A. T. N. Cadmium, zinc, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea: levels, inter specific and geographical. **The Science of the Total Environment**, v. 306, n. 1-3, p. 133-158, 2003. DOI: 10.1016/S0048-9697(02)00489-8.

SCHEUHAMMER, A. M.; NORRIS, S. L. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 5. p. 279-295, 1996. DOI: 10.1007/BF00119051.

SCHUMMER, M. L. et al. Elemental contaminants in livers of mute swans on lakes Erie and St. Clair. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, n. 4, p. 677-687, 2011. DOI: 10.1007/s00244-011-9659-x.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 703 p.

STAFFORD, J. D.; KAMINSKI, R. M.; REINECKE, K. J. Avian Foods, Foraging and Habitat Conservation in World Rice Fields. **Waterbirds**, v. 33, n. sp1, p. 133-150. 2010. DOI: 10.1675/063.033.s110.

THE COCHRANE COLLABORATION. 2016. **The Cochrane Collaboration: Working together to provide the best evidence for health care**. <<http://www.cochrane.org>> Acesso em 23 mar. 2016.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramenta de monitoria ambiental: Análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TSIPOURA, N. et al. Lead, mercury, cadmium, chromium, and arsenic levels in eggs, feathers, and tissues of Canada geese of the New Jersey Meadowlands. **Environmental Research**, v. 111, n. 6, p. 775-784, 2011. DOI: 10.1016/j.envres.2011.05.013.

WETLANDS INTERNATIONAL. **Waterbird Population Estimates**. 1 ed. Summary Report. Wetlands International, Wageningen, The Netherlands, 2012.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, 1993.

WHO. **Trace elements in human nutrition and health**. World Health Organization, Geneva, 1996. 104 p.

WINFREE, R. et al. A meta-analysis of bees responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2068-2076, 2009. DOI: 10.1890/08-1245.1.

WISEMAN, H.; KAUR, H; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Letters**, v. 29, n. 93(1), p. 113-120, 1995. DOI: 10.1016/0304-3835(95)03792-U.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. Metals and other inorganic chemicals. In:\_. **Environmental Toxicology**, Serie 11. Canadá: Cambridge Environmental Chemistry, 2002. cap. 6, p. 248 - 344.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Notices**, 2011. DOI:10.5402/2011/402647

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 217 - 225, 1996. DOI: 10.1007/BF00118992.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VETTER, D.; RÜCKER, G.; STORCH, I. A meta-analysis of tropical forest edge effects on bird nest predation risk: Edge effects in avian nest predation. **Biological Conservation**, v. 159, p. 382-395, 2013. DOI: 10.1016/j.biocon.2012.12.023.

VICENT, H. K.; INNES, K. E.; VICENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesity Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x.