

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO CÁDMIO EM *Geophagus
brasiliensis* (PERCIFORMES: CICHLIDAE)**

EMANUELLE CARNEIRO QUEIROZ

VILA VELHA
FEVEREIRO/ 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO CÁDMIO *EM Geophagus
brasiliensis* (PERCIFORMES: CICHLIDAE)**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, para obtenção do grau de Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

EMANUELLE CARNEIRO QUEIROZ

VILA VELHA

FEVEREIRO/ 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

Q3e

Queiroz, Emanuelle Carneiro.

Efeitos toxicológicos do cádmio em *Geophagus
brasiliensis* (Peciformes: cichlidae) / Emanuelle Carneiro
Queiroz – 2015.

39 f.: il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari Gomes
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas)
Universidade Vila Velha, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Poluição.
I. Gomes, Adriana Regina Chippari. II. Universidade Vila Velha.
III. Título.

CDD 577

EMANUELLE CARNEIRO QUEIROZ

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO CÁDMIO EM *Geophagus
brasiliensis* (PECIFORMES: CICHLIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila
Velha como pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em Ecologia de
Ecossistemas, para obtenção do grau de
Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2016.

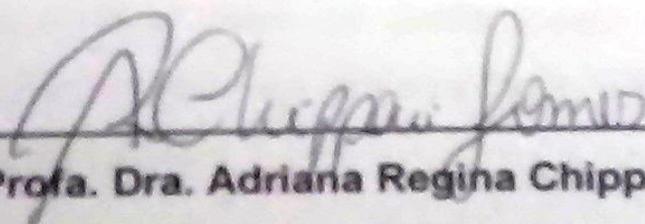
Banca Examinadora:



Profª. Dra. Mércia Barcellos da Costa - UFES



Profª. Dra. Ana Carolina Srbek de Araujo - UVV



Profª. Dra. Adriana Regina Chippari Gomes - UVV

Orientadora

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus pela força, saúde e perseverança a qual foi me concedida para realização deste trabalho.

À Prof^a Adriana Regina Chippari-Gomes, pelas orientações, dedicação e paciência.

Agradeço à minha “mãe Emília” pelo total e imenso apoio ao longo dessa caminhada, por todas as palavras de conforto e força que foram ditas a mim (“você vai conseguir”). Ao meu irmão Paulo Roberto, que se disponibilizou como meu engenheiro criativo e me ajudou em diversas ocasiões quando necessitei. Ao meu Pai, por ter me oferecido ajuda para ingressar no curso e dar início a essa jornada.

A todos os amigos do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (Tati, Júlia, Fred, Karla, Laila, Dandara, Taci, Alê, Rômulo, Gabriel, Lu), a contribuição de todos foi essencial para a conclusão do trabalho. Em especial ao amigo Bruno Ferreira, por ter sido presente em todas as bancadas realizadas no trabalho, e pelo dom de transmitir calma nos momentos em que eu me encontrava aflita.

Aos amigos do laboratório LCQ pela imensa ajuda e risadas.

Ao Jorcy de Oliveira Neto, meu namorado e grande amigo, que me incentivou durante minha árdua caminhada ao longo do curso, e me deu apoio quando me encontrava desanimada.

Aos meus amigos que ingressaram no curso de Ecologia de Ecossistemas, obrigada pelos momentos bons e pelos ruins também (unir forçar é essencial).

Aos funcionários do Biopráticas Nossa Senhora da Penha, pela simpatia e carinho que foram ofertados a mim.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, pelo suporte financeiro, tornando possível a realização do curso e execução da dissertação.

Por último, agradeço a todos os profissionais do Curso de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, da universidade Vila Velha, pelos ensinamentos que levarei para o resto da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Cádmio</i>	2
1.2 <i>Estudos ecotoxicológicos e bioindicadores</i>	3
1.3 <i>Biomarcadores</i>	4
1.3.1 <i>Biomarcadores genéticos</i>	4
1.3.2 <i>Biomarcadores bioquímicos</i>	5
1.4 <i>Modelo biológico</i>	6
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 <i>Objetivos gerais</i>	7
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 <i>Aclimação</i>	8
3.2 <i>Procedimento experimental</i>	8
3.3 <i>Coleta de dados</i>	9
3.3.1 <i>Análise dos parâmetros físico-químicos da água da aclimação e dos grupos experimentais</i>	10
3.3.2 <i>Análise da concentração de cádmio dissolvido na água</i>	10
3.3.3 <i>Análises de morfometria e índice somático</i>	11
3.3.4 <i>Teste do Micronúcleo</i>	11
3.3.5 <i>Ensaio cometa</i>	11
3.3.6 <i>Bioacumulação</i>	12
3.3.7 <i>Análises bioquímicas</i>	13
3.4 <i>Análises estatísticas</i>	14
4. RESULTADOS.....	15

4.1	<i>Análises dos parâmetros físico-químicos da água</i>	15
4.2	<i>Concentrações de cádmio na água</i>	16
4.3	<i>Índice hepatossomático</i>	16
4.4	<i>Teste do Micronúcleo</i>	17
4.5	<i>Ensaio Cometa</i>	18
4.6	<i>Bioacumulação em Brânquia</i>	20
4.7	<i>Bioacumulação em Músculo</i>	21
4.8	<i>Catalase (CAT)</i>	22
4.9	<i>Glutathione-S-transferase (GST)</i>	23
5.	DISCUSSÃO	25
5.1	<i>Índice hepatossomático</i>	25
5.2	<i>Teste do Micronúcleo</i>	25
5.3	<i>Ensaio cometa</i>	26
5.5	<i>Acumulação de cádmio nos tecidos</i>	28
5.6	<i>Atividade da enzima catalase (CAT)</i>	30
5.7	<i>Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)</i>	31
6.	CONCLUSÕES	32
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Índice hepatossomático de indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$).

Figura 2 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como mediana determinada pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

Figura 3 - Frequência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos periféricos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$).

Figura 4 – Valores médios (mg/g) do acúmulo de cádmio pelas brânquias dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos em mediana e erro padrão da mediana, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

Figura 5 – Valores médios (mg/g) do acúmulo de cádmio pelo tecido muscular esquelético dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos em mediana,

determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

Figura 6 – Atividade enzimática da catalase (CAT) no fígado de exemplares de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$).

Figura 7 – Atividade enzimática da glutatona S-transferase no fígado de exemplares de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para determinar diferenças estatísticas entre os grupos analisados. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água referente ao experimento de duração de 7 dias com indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações de cádmio. Os dados estão expressos em forma de média e erro padrão da média.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos da água referente ao experimento de duração de 14 dias com indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações de cádmio. Os dados estão expressos em forma de média e erro padrão da média.

RESUMO

QUEIROZ, Emanuelle Carneiro, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2016. **Efeitos toxicológicos do cádmio em *Geophagus brasiliensis* (Peciformes: Cichlidae)**. Orientadora: Adriana Regina Chippari Gomes.

Devido ao crescente avanço urbano e a intensificação das atividades industriais e agropecuárias os ecossistemas aquáticos vêm sendo ameaçados uma vez que o destino final dos resíduos dessas atividades são os corpos hídricos. Dentre os diversos tipos de poluentes (orgânicos e inorgânicos) introduzidos no ambiente aquático, os metais são considerados um dos mais preocupantes devido a sua elevada toxicidade, persistência no ambiente, e capacidade de bioacumulação e biomagnificação por parte dos organismos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos do cádmio nas seguintes concentrações: 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L, em indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos por um período de 7 e 14 dias, por meio de análises genotóxicas, bioquímicas e bioacumulativas. O índice hepatossomático exibiu diferença significativa em indivíduos expostos a 0,01mg/L de Cd pelo período de 7 dias. O teste do micronúcleo demonstrou que o Cd não possui um forte poder mutagênico nas concentrações utilizadas e nos períodos de exposição (7 e 14 dias). Em contrapartida, o ensaio cometa exibiu diferenças estatísticas no índice de danos ao DNA entre as concentrações de Cd utilizadas ($p < 0,05$) a partir da concentração de 0,1 mg/L (7 dias). Em relação ao acúmulo de Cd pela brânquia, foi visto que há uma forte relação de tempo-dependência ($p = < 0,001$) e um acúmulo maior nos grupos expostos a partir de 0,1mg/L ($p < 0,05$). No músculo houve a relação de tempo-dependência ($p = < 0,001$) e acúmulo maior em grupos expostos a 1,0mg/L de Cd (14 dias). A atividade da CAT diferenciou-se estatisticamente ($p < 0,05$) apenas em relação ao tempo de exposição, sendo que a atividade elevou-se após 14 dias de exposição no grupo controle, de 0,1 e 1,0 mg/L de Cd. A atividade da GST diferenciou-se estatisticamente em relação a concentração de um mesmo tempo de exposição e entre os diferentes tempos de exposição (7 e 14 dias) apenas no grupo exposto a 1,0mg/L de Cd, exibindo um aumento da atividade.

Palavras-chave: genotoxicidade, cádmio, bioacumulação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

QUEIROZ, Emanuelle Carneiro, M.Sc., Vila Velha University – ES, february, 2016. **Toxicological effects of cadmium in *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae)**. Advisor: Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes.

The increasing urban advancement and intensification of industrial and agricultural activities aquatic ecosystems are being threatened as the final destination of the waste of these activities are water bodies. Among the various types of pollutants (organic and inorganic) introduced into the aquatic environment, metals are considered one of the most concern due to its high toxicity, persistence in the environment, and bioaccumulation and biomagnification capacity by the bodies. Therefore, this study aimed to evaluate the possible toxic effects of cadmium in the following concentrations: 0.01, 0.1 and 1.0 mg / L in individuals of pearl cichlid exposed for a period of 7 and 14 days, by through genotoxic, biochemical analysis and bioaccumulative. The hepatosomatic index exhibited significant difference in individuals exposed to 0.01 mg / L Cd for a period of 7 days. The micronucleus test showed that the Cd does not have a strong mutagen power used in concentrations and exposure periods (7 and 14 days). In contrast, the comet assay showed statistical differences in DNA damage ratio between Cd concentrations used ($p < 0.05$) from the concentration of 0.1 mg / L (7 days). Regarding the Cd accumulation by Gill, it was seen that there is a strong time-dependent relationship ($p = < 0.001$) and a greater accumulation in exposed groups from 0.1mg / L ($p < 0.05$). In muscle there was a time-dependent relationship ($p = < 0.001$) and greater accumulation in groups exposed to 1.0mg / L Cd (14 days). CAT activity differed statistically ($p < 0.05$) relative to exposure time, and the activity rose after 14 days of exposure in the control group, 0.1 and 1.0 mg / L Cd. the GST activity differed statistically compared to the same concentration and exposure time between the different exposure times (7 and 14) only in the group exposed to 1.0mg / L Cd, showing an increase activity.

Keywords: genotoxicity, cadmium, bioaccumulation, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescente avanço urbano e a intensificação das atividades industriais e agropecuárias ameaçam os ecossistemas aquáticos em grande parte do mundo, uma vez que o destino final dos resíduos dessas atividades são os corpos hídricos. Dentre os diversos tipos de poluentes (orgânicos e inorgânicos) introduzidos no ambiente aquático, os metais são considerados uns dos mais preocupantes devido a sua elevada toxicidade, persistência no ambiente, e capacidade de bioacumulação e biomagnificação por parte dos organismos (Morgano et al., 2005; Jidal e Verma, 2015). Sendo assim, a presença dos metais gera preocupações tanto no nível ecológico, por serem capazes de causar efeitos deletérios à saúde da biota aquática, quanto no nível de saúde pública, visto que diversos organismos aquáticos são usados na dieta humana (Chen et al., 2011).

Geralmente, os metais tendem a ser distribuídos nos diversos compartimentos ambientais, principalmente nos sedimentos e na biota, também podendo ser encontrados nas águas, dependendo das condições ambientais. Embora os metais sejam incorporados aos sistemas aquáticos naturalmente por meio de processos geoquímicos, o aumento da introdução desses elementos tem ocorrido por meio de atividades oriundas do processo de urbanização e industrialização (Moraes e Jordão, 2002; Virga et al., 2007). No geral, os metais têm sido descritos como possíveis ocasionadores de efeitos letais ou subletais em inúmeros componentes da biota, tais como o fitoplâncton, zooplâncton, comunidades bentônicas, peixes entre outros vertebrados aquáticos, aves marinhas e o ser humano (Carmo et al., 2011).

Os metais podem ser classificados como essenciais e não essenciais, o primeiro é composto por metais, tais como, o ferro, que é um metal requerido por grande parte dos organismos vivos, e pode ser encontrado presente em enzimas de diversas classes, em proteínas de transferência eletrônica (ferro-enxofre e citocromos), proteínas de armazenamento, transportadoras ou até mesmo como sensor de moléculas pequenas (monóxido de carbono, óxido nítrico e oxigênio

molecular), o manganês, que assim como o ferro também pode estar presente em várias enzimas no lugar de outros íons metálicos divalentes e sem atividade de oxirredução, e o cobre, que se encontra presente em diversas enzimas que atuam na atividade de oxirredução, no sistema de transferência eletrônica (proteínas azuis de cobre), assim como em proteínas transportadoras de O₂ (hemocianinas), entre outros metais que pode ser considerados essenciais (Silva, 2013). Esses metais essenciais são encontrados nos solos, ar, água e alimentos. Porém, o excesso desses elementos pode ocasionar distúrbios nos organismos, e em casos extremos, pode levar até mesmo a morte. Já os metais não essenciais, tais como, o alumínio, arsênio, bário, berílio, cádmio, chumbo, mercúrio e o níquel, são elementos que podem alterar estruturas celulares (membrana), enzimáticas e substituir metais co-fatores de atividades enzimáticas (competição por locais de fixação) (Morgano et al., 2005; Virga et al., 2007).

1.1 Cádmio

O cádmio, sendo um elemento não essencial, é conhecido por exercer severos efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos até mesmo quando encontrados em baixas concentrações no ambiente (Jidal e Verma, 2015). Atualmente esse metal é bastante utilizado pelas indústrias, sendo empregado em revestimentos metálicos, soldadura, pilhas, baterias e podem ser introduzidos na atmosfera por meio da fundição de minério e queima de combustíveis fósseis (Dangre e Brouwer, 2010; Al-Asgah et al., 2015). A acumulação desse metal tem sido descrita como uma possível causa de alterações das funções bioquímicas e fisiológicas essenciais aos organismos (Souid et al., 2013). Em peixes, o cádmio geralmente tem sido associado a danos na estrutura dos órgãos, a alterações nos parâmetros de glóbulos vermelhos, no nível de glicose, na regulação osmótica, na estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o peróxido lipídico (LOOH), sendo estas, possíveis responsáveis por causar danos às células e tecidos, associados a diferentes processos patológicos, devido às alterações nas atividades enzimáticas relacionadas ao estresse oxidativo (Basha e Rani, 2003;; Souid et al., 2013; Qu et al., 2014;).

De acordo com a Resolução CONAMA 357/05, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, o limite máximo permitido de cádmio no meio aquático para águas de classe III é de 10 µg/L, que compreendem as águas destinadas a consumo humano e animal, após tratamento simples, convencional ou avançado. Porém, é visto que altas concentrações de cádmio têm sido encontradas em alguns corpos de água do país, como por exemplo, no Lago Extremoz, localizado no Rio Grande do Norte, onde foi quantificado até 15 µg/L de cádmio na água (Barbosa et al, 2010). Mesmo que a concentração determinada pelo CONAMA, como citado acima e possíveis concentrações encontradas no ambiente, não sejam o suficiente para causar efeitos letais aos organismos, concentrações próximas a estas podem ocasionar diversos efeitos fisiológicos, genotóxicos e bioacumulativos em diversos organismos (Çavas et al., 2005; Lewińska et al., 2007; Aramphongphan et al., 2009; Isani et al., 2009; Ahmed et al., 2010; Qu et al., 2014; Jindal e Verma, 2015;).

Dessa forma, programas de biomonitoramento em recursos hídricos podem ser utilizados para detectar a presença e quantificar a concentração do cádmio presente na biota, assim como seus possíveis efeitos tóxicos, uma vez que apenas análises químicas da água e do sedimento não sejam o suficiente para indicar possíveis efeitos tóxicos do cádmio (Freire, 2008; Magalhães e Filho, 2008).

1.2 *Estudos ecotoxicológicos e bioindicadores*

A ecotoxicologia é tida como uma ferramenta do biomonitoramento, que tem por finalidade analisar as interações entre diversas substâncias químicas e organismos (Arias et al., 2007). Essa área da biologia é responsável por realizar bioensaios, sendo o teste de toxicidade o mais comum, que é utilizado para identificar os efeitos de substâncias sintéticas e/ou naturais sobre os organismos vivos a nível individual, relacionado a alterações no comportamento, na reprodução, na alimentação, no crescimento, malformações, alterações enzimáticas e fisiológicas. Assim como, em níveis superiores de organização biológica, tais como populações, comunidades e ecossistemas (Arias et al., 2007). A exposição dos organismos é feita em diferentes concentrações de compostos químicos, amostras de efluentes, sedimentos em fase sólida, e água intersticial ou água bruta, por um período de tempo (Magalhães e Ferrão, 2008). Os bioensaios permitem determinar

limites permissíveis para diferentes compostos químicos e avaliar o impacto dos contaminantes em organismos de um determinado ambiente (Bertoletti, 1990).

Os organismos utilizados na ecotoxicologia são denominados de bioindicadores, cuja escolha é feita com base nas espécies que apresentam: uma maior sensibilidade a mudanças do ambiente; de fácil identificação taxonômica; de ampla distribuição; baixa locomoção; que sejam bem conhecidas suas características ecológicas; de grande abundância; boa adequação a experimentos em laboratório e grande capacidade de serem quantificados e padronizados (Li Li et al., 2010). Espécies de peixes, macroinvertebrados bentônicos e perifíton têm sido nacionalmente e internacionalmente empregadas em bioensaios entre os quais se destacam os peixes cuja importância é devido à sua posição-chave na cadeia trófica. Além disso, por apresentarem longo ciclo de vida e territorialidade, esses organismos podem ser bons indicadores de efeitos e de condições de habitats em geral a longo prazo (Maceda-Vieira et al., 2007; Li Li et al., 2010).

1.3 Biomarcadores

No contexto de ensaios ecotoxicológicos, os bioindicadores são utilizados para analisar e determinar os possíveis efeitos de diversos agentes tóxicos na fisiologia, mutagenicidade, genotoxicidade, acumulação e nas defesas oxidativas dos organismos. Para que esses possíveis efeitos possam ser analisados, quantificados e caracterizados, é necessário o auxílio dos marcadores biológicos (biomarcadores) que podem ser vantajosos para indicar o nível de impacto na biota (bioindicadores). Os biomarcadores podem ser determinados como: alterações nas estruturas moleculares, celulares, mudanças bioquímicas ou fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou do efeito de substâncias estranhas a um organismo (Freire et al., 2008).

1.3.1 Biomarcadores genéticos

Os biomarcadores genotóxicos têm sido muito utilizados para avaliar danos genéticos causados por substâncias xenobióticas nos organismos. O ensaio cometa (ou teste em eletroforese em gel de células individuais) é utilizado para testar agentes genotóxicos, principalmente de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, bem como em programas de biomonitoramento de populações expostas a xenobióticos, sendo assim possível detectar danos ao DNA (Bücker et al., 2006). Esses danos são analisados e classificados de acordo com a extensão dos fragmentos do material genético, que são obtidos pela passagem de correntes elétricas (Frenzilli et al., 2009).

O teste do micronúcleo em eritrócitos também é bastante utilizado para determinar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Os micronúcleos podem aparecer quando um cromossomo inteiro (evento aneugênico) ou apenas seu fragmento (clastogênico) falha ao migrar com um dos dois núcleos formados durante a divisão celular, sendo provocados em maior intensidade em presença de agentes tóxicos. Esse teste pode ser empregado tanto em pesquisas em laboratórios (para avaliar a genotoxicidade de xenobióticos) quanto no campo (para avaliar a qualidade da água) graças à sua facilidade de aplicação e eficácia (Çavas et al., 2005; Udriou, 2006).

1.3.2 Biomarcadores bioquímicos

Atualmente, os biomarcadores bioquímicos são bastante utilizados em estudos relacionados à toxicologia de ambientes aquáticos. A primeira linha de defesa das células quando expostas a substâncias estranhas ao organismo é composta por respostas bioquímicas (Adams, 2002). Essas respostas são capazes de indicar as interações que ocorrem entre uma determinada substância tóxica e o seu alvo, que geralmente alteram a expressão de uma ou mais proteínas cuja finalidade é, por meio da biotransformação, fazer com que uma substância seja mais facilmente excretada ou promover sinais moleculares que podem iniciar mais de uma resposta fisiológica no organismo. As enzimas principais de defesa antioxidante em organismos desses ambientes são: catalase (CAT), e a fase II da enzima de biotransformação da glutathione S-transferase (GST) respectivamente descritas abaixo (Adams, 2002).

A CAT é encontrada dentro dos peroxissomos e catalisa o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Essa enzima é mais importante em condições de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos (Vannucchi et al., 1998).

Por fim, a GST representa a família multigênica de enzimas, que desempenha um importante papel no metabolismo, atuando na detoxificação dos organismos de certo número de compostos eletrófilos. Alterações nas atividades dessa enzima refletem diretamente nos distúrbios metabólicos e danos às células em órgãos específicos de peixes (Carvalho-Neta e Abreu-Silva, 2013).

1.4 Modelo Biológico

O modelo biológico escolhido para este estudo foi o ciclídeo *Geophagus brasilienses*, espécie nativa do território brasileiro, popularmente chamado de cará, acará ou papa-terra. Seu habitat natural é geralmente ambientes lênticos, como: lagos, riachos, lagoas costeiras e lagoas de planície de inundação. Por apresentarem comportamentos de territorialíssimo são animais que não apresentam grande distanciamento de seu habitat. Apresentam hábitos diurnos, e orientação visual. Possui hábito alimentar onívoro e geralmente se alimentam de invertebrados associados ao substrato. A reprodução ocorre durante todo o ano, porém em maior intensidade no período chuvoso (Abelha e Goulart, 2004; Vieira et al., 2014).

1. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Este trabalho teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos do cádmio em indivíduos de *Geophagus brasiliensis* por meio de análises genotóxicas, bioquímicas e bioacumulativas.

2.2 *Objetivos específicos*

De forma mais específica, este trabalho visou detectar os possíveis efeitos tóxicos de cádmio nas concentrações nominais de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L em exemplares de Acará (*Geophagus brasiliensis*), após exposição de 168h (7 dias) e 336h (14 dias), por meio das seguintes análises:

- 1 - Índice somático de fígado;
- 2 - Genotóxicas por meio teste do micronúcleo em eritrócitos e do ensaio cometa;
- 3 - Bioquímicas por meio de medições das atividades das enzimas do estresse oxidativo (CAT e GST) no tecido hepático;
- 4 - Bioacumulação de cádmio em tecido branquial e muscular esquelético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aclimação

Foram utilizados 64 indivíduos juvenis ($10,56 \pm 0,43$ g, $8,55 \pm 0,11$ cm), da espécie *Geophagus brasiliensis*, adquiridos em um criador particular de Guarapari, ES, e transferidos para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB PEIXE), da Universidade Vila Velha (UVV), ES, onde foram aclimatados durante 30 dias, com fotoperíodo controlado (12 h claro e 12 h escuro). Os animais foram mantidos em aquários de polietileno de 500 L, dotados de aeração constante. Durante o período de aclimação os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 52 % de proteína bruta (NRC 1.2 da empresa INVE). A água do tanque de aclimação foi trocada uma vez por semana, em 70 % do volume total.

Todos os procedimentos adotados durante os experimentos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso animal (CEUA) da Universidade Vila Velha, protocolo nº 342/2015.

3.2 Procedimento experimental

Posteriormente ao período de aclimação dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis*, foi verificado o status de saúde dos animais, e não sendo observados sinais de doenças ou recusa de alimento, foi dado início às etapas dos experimentos.

Os peixes foram transferidos do tanque de aclimação para aquários testes de vidro (6l) com aeração constante. O experimento tanto de 7 dias quanto de 14 dias de exposição consistiram em quatro grupos experimentais, tendo em cada um dos grupos o número amostral de 8 indivíduos: (I) controle, sem contaminante; (II) 0,01 mg/L de cádmio; (III) 0,1 mg/L de cádmio e (IV) 1,0 mg/L de cádmio. Os indivíduos de *Geophagus brasiliensis* foram expostos às concentrações citadas acima, nos períodos de tempo de 168 h (7dias) e 336 h (14 dias), via exposição hídrica, em aquários individuais.

O experimento foi conduzido em sistema semi-estático com troca parcial da água de 50% para os grupos expostos durante 7 dias e de 70% para os grupos expostos durante 14 dias.

A concentração de cádmio de 0,01mg/L utilizada em um dos grupos experimentais de ambos os tempos de exposição (7 e 14 dias) foi baseada na Resolução CONAMA nº 357/05 para água doce de classe 3; a concentração de 0,1 mg/L tem sido utilizada em estudos relacionados a genotoxicidade (Çavas et al., 2004); e a concentração de 1,0 mg/L foi escolhida pois simula grandes concentrações de cádmio sendo introduzidas no ambiente (Bhagure et al., 2009).

Foi utilizado no trabalho o cloreto de cádmio P.A ($\text{CdCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$), de peso molecular 201,33, da marca Cromoline. O CdCl_2 foi adicionado aos aquários por meio de uma solução mãe, a qual possuía 2 mg de cádmio a cada 1 ml de solução.

3.3 Coleta de dados

Posteriormente ao término dos experimentos, os indivíduos de *Geophagus brasiliensis* foram anestesiados com uma solução de benzocaína 0,1 mg/L. Em seguida, o sangue foi coletado por punção caudal, com seringas previamente heparinizadas, para ser utilizado nas análises do teste do micronúcleo e cometa. Após a retirada do sangue os peixes foram pesados e medidos para morfometria. Para a coleta de tecidos, os peixes foram sacrificados por meio de secção cervical. O fígado foi pesado para cálculo do índice somático e armazenado em micro tubo para análise bioquímica em freezer -80°C. Para análise de bioacumulação foi utilizado o tecido muscular esquelético lateral e branquial armazenados em freezer -20°C.

3.3.1 Análise dos parâmetros físico-químicos da água da aclimação e dos grupos experimentais

Os parâmetros físicos da água da aclimação e dos grupos experimentais foram medidos com o auxílio do equipamento oxímetro YSI, modelo DO 200, para oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C), condutivímetro YSI, modelo EC 300, para condutividade elétrica ($\mu\text{s}/\text{cm}$) e salinidade e pH por meio do modelo de bancada Hanna HI 2223. Os parâmetros químicos como amônia e nitrito foram analisados de acordo com APHA (1998). As análises dos parâmetros físico-químicos foram realizadas após 48 horas do início do experimento, e 48 horas antes do término do experimento, essa regra seguiu para aclimação e demais experimentos.

3.3.2 Análise da concentração de cádmio dissolvido na água

Tanto no experimento de 7 dias quanto no de 14 dias, foram realizadas coletas de água (100 ml) em três aquários (fixos) determinados em cada grupo experimental, incluindo o grupo controle. As coletas foram executadas no e no tempo zero (antes e depois de contaminar a água pela primeira vez) e antes e após a troca de água a cada 48 horas. Para o experimento de uma semana, foram realizadas coletas a cada 72 horas, totalizando três coletas, e, para o experimento de duas semanas foram realizadas coletas a cada 96 horas, totalizando quatro coletas. As amostras de água coletadas foram acidificadas com ácido nítrico 65%, e foram devidamente armazenadas em geladeira comum até o dia da análise (EPA,1992).

Para a execução da análise, as amostras de água foram filtradas com filtros da marca analítica, de 13mm e poro de $0,45\mu\text{m}$, pré-limpo e não estéril. Após a filtragem as amostras foram analisadas por meio do Espectrofotômetro de Absorção Atômica, no modo grafite (analítica, ICE 3300). Os resultados foram expressos em mg/L.

3.3.3 Análises de morfometria e índice somático

Foram medidas para cada indivíduo as seguintes características morfométricas: comprimento total (CT) com a unidade de medida em milímetros e peso corporal (g).

Para o índice somático; foram pesados os fígados e calculado pela fórmula: $IS = \text{Peso do órgão (g)} / \text{Peso corporal (g)} * 100$ (Sloof et al., 1983; Navarro et al., 2006).

3.3.4 Micronúcleo

O sangue de cada indivíduo foi coletado e gotejado sobre duas lâminas de microscopia para a realização da extensão sanguínea. Após serem secas em temperatura ambiente, as lâminas foram submetidas a um banho de 30 minutos em Metanol P.A. (100 %) para fixação. Em seguida foram coradas com uma solução de Giemsa 5 % por 40 minutos; lavadas posteriormente com água destilada e secas novamente em temperatura ambiente, como descrito por Grisolia et al. (2005). Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico (400x). Mil eritrócitos foram contados em cada lâmina para a quantificação dos micronúcleos presentes. Foram produzidas 2 lâminas por indivíduo.

3.3.5 Ensaio cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio alcalino do cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000) e Andrade et al. (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em um microgel de agarose. Para isso, lâminas de microscopia, duas para cada exemplar de *G. brasiliensis*, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80 g de agarose e 120 mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 µL do sangue diluído foi misturado com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão ou “low

melting” (0,15 g de agarose em 20 mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40 °C. Em seguida, foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para o gel se aderir uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocadas em uma solução de lise [(146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM) 1,2 g de Tris (10 mM) e 1 litro de água destilada; e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e, no momento do uso, foi adicionado 1 % de Triton X-100 e 10 % DMSO)] por, no mínimo, 2 h em geladeira e protegidos da luz. Após o período da lise celular, as lâminas foram colocadas em uma cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por um período de 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 minutos por três vezes e lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2 h a 37 °C. Após esse período, as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15 % de ácido tricloroacético, 5 % de sulfato de zinco (heptahidratado), 5 % de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37 °C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min com água destilada e coradas com solução de coloração com prata [(66 mL da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de carbonato de cálcio para 250 mL de água) e 34 mL da solução de nitrato de prata (50 mg de nitrato de prata, 50 mg de nitrato de amônio, 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído)] por 15 min a 37 °C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e então submersas por 5 min em solução stop (ácido acético 1 %). Passados os 5 minutos de reação, foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente por um período de 24 h.

Foram contabilizadas 200 células por animal (100 por lâmina), selecionadas aleatoriamente e não- sobrepostas. Cem células foram analisadas por lâmina, e duas lâminas foram analisadas por indivíduo. Os danos ao DNA foram classificados em cinco classes: classe 0 (ausência de cauda – sem danos); classe I (cauda é menor que o diâmetro do núcleo – dano pequeno); classe II (cauda com comprimento que varia de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo – dano médio); classe III (cauda com comprimento 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo - dano extensivo) e classe IV (ausência de um núcleo principal – dano máximo) (Grazeffe et al., 2008).

O índice de danos (ID) analisado pelo ensaio cometa foi calculado com a somatória do número de nucleóides observados em cada classe de dano multiplicado pelo valor de sua respectiva classe de danos. Os resultados foram expressos como a média de dano, para cada período de exposição. Em todo o experimento, as células foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador.

3.3.6 *Bioacumulação*

A análise da acumulação do cádmio nas brânquias e no músculo esquelético foi realizada de acordo com Boock e Machado Neto (2005), porém com as devidas adaptações para o presente trabalho. Primeiramente, foi medido o peso úmido de ambos tecidos. Em seguida as amostras foram armazenadas em tubos falcon (14 ml), onde foi acrescentado 1 ml de ácido nítrico (65 %) para a digestão, logo após, os tubos falcon foram para o banho-maria (90-100 °C) onde permaneceram por 30 minutos com a finalidade de acelerar o processo de digestão. Após as amostras serem completamente digeridas, foi realizada uma diluição a 10,5 de água milliQ. As amostras foram armazenadas até o momento da leitura e antes da leitura as amostras foram filtradas com filtros da marca analítica, de 13 mm e poro de 0,45 µm, pré-limpo e não estéril.

A concentração do cádmio nas amostras digeridas foi determinada pelo espectrofotômetro de absorção atômica, no modo grafite (analítica, ASS ICE 3300), pelo Laboratório de Ictiologia Aplicada (LABPEIXE) da Universidade Vila Velha (UVV). Os resultados foram expressos em mg/g (peso úmido).

3.3.7 *Análises bioquímicas*

Os tecidos hepático e branquial dos animais foram descongelados e homogeneizados com tampão fosfato (pH 7,0) e após serem centrifugados (13000 RPM) por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante obtido foi utilizado para as dosagens enzimáticas e para a quantificação de proteínas totais.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6): A CAT foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 240 nm (Aebi,1984). Para isso foi usado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10 mM e tampão TE (Tris HCL 1 M e EDTA 5 mM), as amostras foram diluídas 100x no tampão TE. Para leitura, 10 µl do homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 900 µl de tampão de reação, lidas em 240 nm no espectrofotômetro SP – 220 (Biospectro).

Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18): A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda em 340 nm, em um leitor de placa (Molecular Devices, modelo SpectraMax 190). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig et al.,1974; Habig e Jakoby, 1981).

Para que fossem realizados os cálculos para determinar a atividade das enzimas, foi determinado a dosagem de proteínas totais, essa concentração de proteínas, nos tecidos, foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As leituras das amostras foram realizadas em 750 nm no espectrofotômetro SP – 220 (Biospectro).

3.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos no teste do micronúcleo, bioacumulação do cádmio nas brânquias e no músculo esquelético foram expressos como mediana. Os demais resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos (grupo controle, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L de cloreto de cádmio) foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey (p<0,05) para evidenciar grupos com diferenças estatísticas significativas entre si. Os dados foram analisados pelo programa Sigma Stat 2.0.

3. RESULTADOS

4.1 Análises dos parâmetros físico-químicos da água

Não houve morte (ou perda) de indivíduos ao longo de todo o experimento realizado.

Os parâmetros físico-químicos da água de mostraram um padrão de qualidade da água aceitável para a realização dos experimentos (Tabelas 1 e 2), sem que esses parâmetros influenciassem nos resultados obtidos.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água referente ao experimento de duração de 7 dias com indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações de cádmio. Os dados estão expressos em forma de média e erro padrão da média.

Parâmetros	Controle	0,01 mg/L	0,1 mg/L	1,0 mg/L
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,96 ± 0,17	7,79 ± 0,11	8,03 ± 0,11	7,93 ± 0,09
Temperatura (°C)	23,35 ± 0,05	23,20 ± 0,04	23,46 ± 0,27	23,26 ± 0,27
Condutividade (µs/cm)	129,2 ± 0,87	119,4 ± 2,42	137,3 ± 3,69	148,7 ± 17,06
Amônia (mg/L)	1,30 ± 0,13	1,27 ± 0,09	1,28 ± 0,05	1,09 ± 0,005
Nitrito (mg/L)	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,0	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00
pH (unidade)	7,30 ± 0,02	7,20 ± 0,00	7,12 ± 0,02	7,93 ± 0,09
Salinidade	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos da água referente ao experimento de duração de 14 dias com indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações de cádmio. Os dados estão expressos em forma de média e erro padrão da média.

Parâmetros	Controle	0,01 mg/L	0,1 mg/L	1,0 mg/L
Oxigênio dissolvido (mg/L)	8,08 ± 0,10	8,09 ± 0,09	8,07 ± 0,08	8,07 ± 0,02
Temperatura (°C)	23,50 ± 0,16	23,30 ± 0,28	23,60 ± 0,07	23,40 ± 0,18
Condutividade (µs/cm)	117,2 ± 6,70	136,0 ± 8,38	94,90 ± 2,40	97,80 ± 0,05
Amônia (mg/L)	0,90 ± 0,007	0,94 ± 0,20	0,64 ± 0,07	0,90 ± 0,00
Nitrito (mg/L)	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,003	0,09 ± 0,001	0,002 ± 0,001
pH (unidade)	7,07 ± 0,09	7,09 ± 0,03	7,05 ± 0,04	7,11 ± 0,01
Salinidade	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00

4.2 Concentrações de cádmio na água

Os indivíduos de *G. brasiliensis* foram expostos às seguintes concentrações nominais de cádmio: 0 (controle); 0,01 mg/L; 0,1 mg/L e 1,0 mg/L.

No entanto, a concentração média de cádmio dissolvida na água para cada tratamento na exposição de 7 dias foi: 0 (controle); 0,005 mg/L; 0,039 mg/L e 0,55 mg/L, respectivamente. E a concentração de cádmio dissolvida na água para cada tratamento na exposição de 14 dias foi: 0,0035 mg/L (controle); 0,012 mg/L; 0,07 mg/L e 0,67 mg/L, respectivamente.

4.3 Índice hepatossomático

De acordo com os dados obtidos, é visto que apenas ocorreu uma diferença significativa ($p < 0,05$) do índice hepatossomático em indivíduos que foram expostos a 0,01 mg/L de Cd durante 7 dias quando comparados com o grupo controle (Figura 1). Os demais grupos que foram expostos às diferentes concentrações nominais de Cd não exibiram diferenças significativas tanto após a exposição de 7 dias quanto após a exposição de 14 dias. Em relação ao tempo de exposição, não houve diferença significativa no índice hepatossomático entre a exposição de 7 e 14 dias de duração.

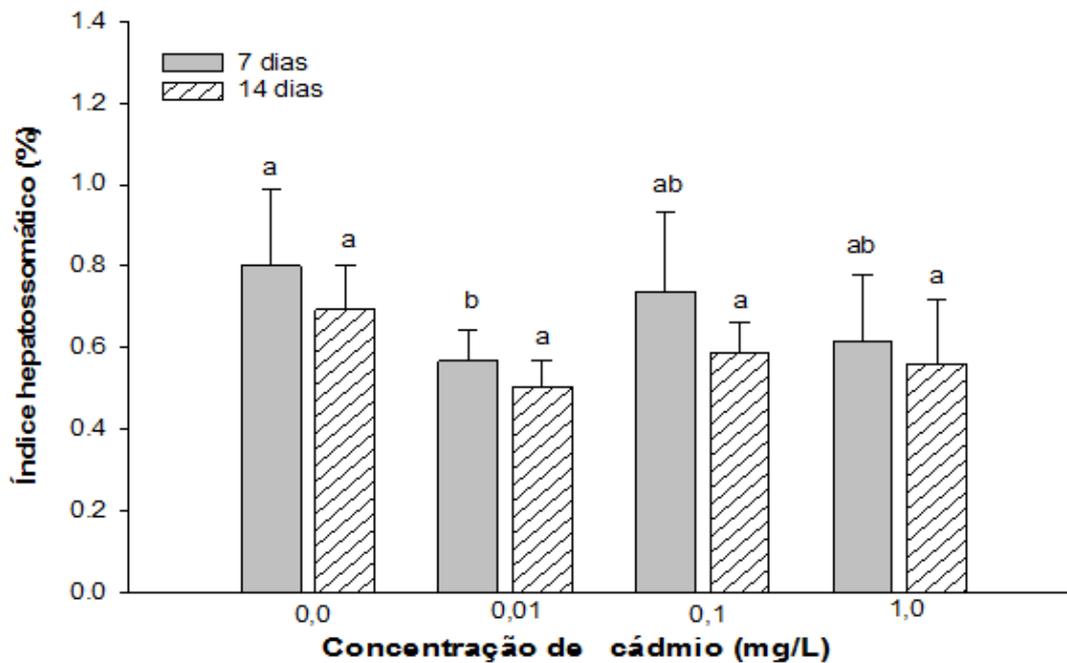


Figura 1 – Índice hepatossomático de indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entres os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$).

4.4 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi executado em eritrócitos de *G. brasiliensis* expostos a três concentrações de cádmio. Não foi observada relação dose-dependência entre os grupos expostos às diferentes concentrações de cádmio, tanto no experimento de duração de 7 dias quanto no de 14 dias (Figura 2). Também não foi observada uma relação tempo-dependência entre os grupos expostos no período de 7 e 14 dias.

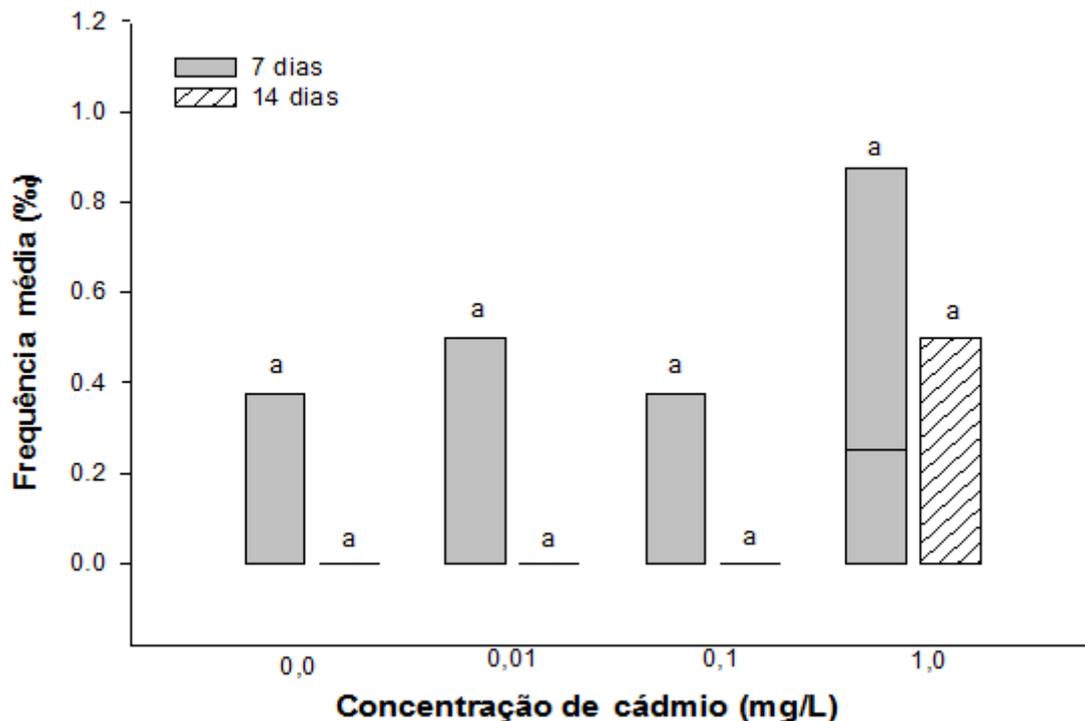


Figura 2 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como mediana determinada pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entres os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

4.5 Ensaio do Cometa

De acordo com os resultados obtidos, é visto que o índice de danos (ID) no DNA (Figura 3), tanto no experimento de duração de uma semana quanto no de duas semanas, apresentou significativa relação dose-dependência ($p < 0,001$), mostrando que os danos ao DNA foram maiores à medida que a concentração de Cd aumentou.

No experimento de uma semana de duração, houve diferença significativa no índice de danos nos grupos expostos às concentrações de 0,1 mg/L e 1,0 mg/L quando comparados ao grupo controle e 0,01mg/L, porém entre eles o índice de

danos foi semelhante. Também foi observada diferença significativa entre os grupos expostos às concentrações 0,01 mg/L e 0,1 mg/L e 1,0mg/L de cádmio, porém não há diferença entre o grupo controle e o exposto a 0,01 mg/L.

Já no experimento de duas semanas de duração, foi visto uma diferença significativa entre o grupo de 1,0 mg/L quando comparado ao grupo controle e ao grupo de 0,01 mg/L, porém o índice de danos foi semelhante ao grupo exposto a 0,1 mg/L. Por sua vez o grupo exposto a 0,1 mg/L obteve um índice de dano similar ao grupo exposto a 0,01 mg/L; e, por fim, o grupo exposto a concentração de 0,01 mg/L obteve um índice de danos similar ao grupo controle.

Em relação ao tempo de exposição de 7 e 14 dias, não houve relação tempo-dependência, mostrando que os tempos de exposição testados não influenciam no índice de danos causados ao DNA.

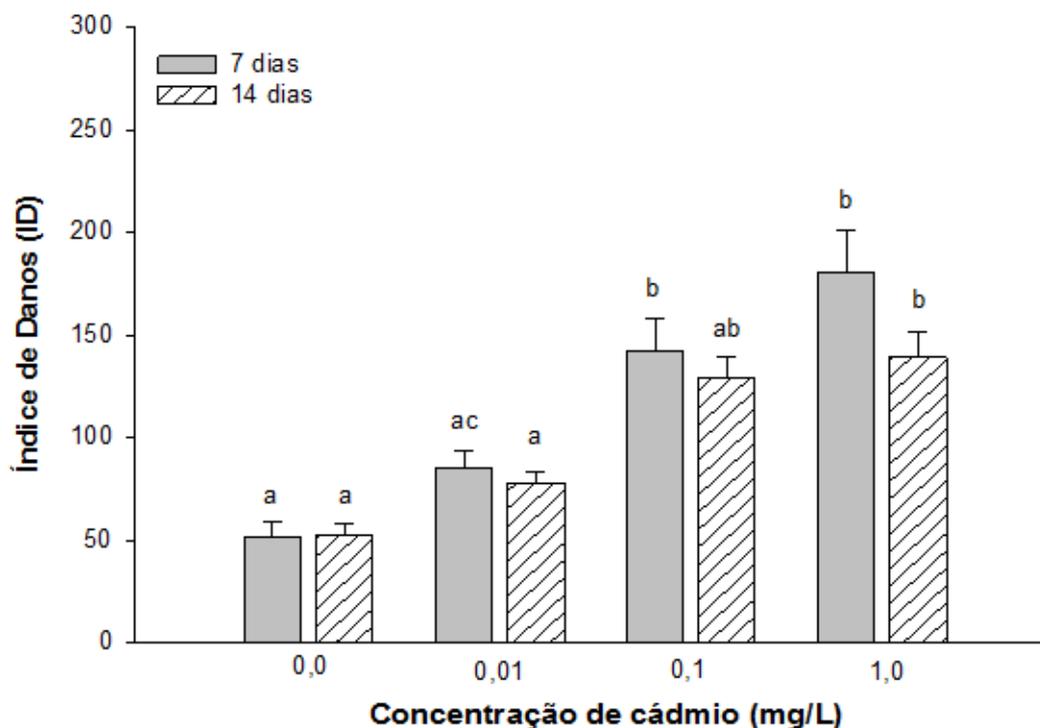


Figura 3 - Frequência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos periféricos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entres os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam

diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$).

4.6 Bioacumulação em Brânquias

De acordo com os dados analisados, foi visto que o acúmulo de cádmio nas brânquias de indivíduos de *G. brasiliensis* exibe uma significativa relação tempo-dependência ($p < 0,001$) (Figura 4), onde existe um acúmulo de cádmio significativo nos grupos expostos a 0,1 e 1 mg/L, em 14 dias de exposição, quando comparados, respectivamente, com os grupos expostos a 7 dias, nas mesmas concentrações.

No experimento de duração de uma semana, foi observado que o grupo exposto à concentração de 1,0 mg/L acumulou concentrações mais elevadas de cádmio quando comparado com os demais grupos, diferenciando-se significativamente (Figura 4). Já os grupos expostos às concentrações de 0 (controle) e 0,1 mg/L apresentaram uma acumulação semelhante, enquanto o grupo exposto a 0,01 mg/L apresentou um acúmulo semelhante ao grupo exposto a 1,0 mg/L.

No experimento de duração de duas semanas, pode ser observado que assim como no experimento de uma semana de duração, o grupo exposto à concentração de 1,0 mg/L acumulou concentrações mais elevadas de cádmio quando comparado aos demais grupos, também diferenciando-se significativamente (Figura 4). Por sua vez, a acumulação do grupo controle e do grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L foi semelhante. O acúmulo de Cd no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L foi semelhante à do grupo exposto a 0,1 mg/L, que, por sua vez, foi diferenciado-se significativamente do grupo controle.

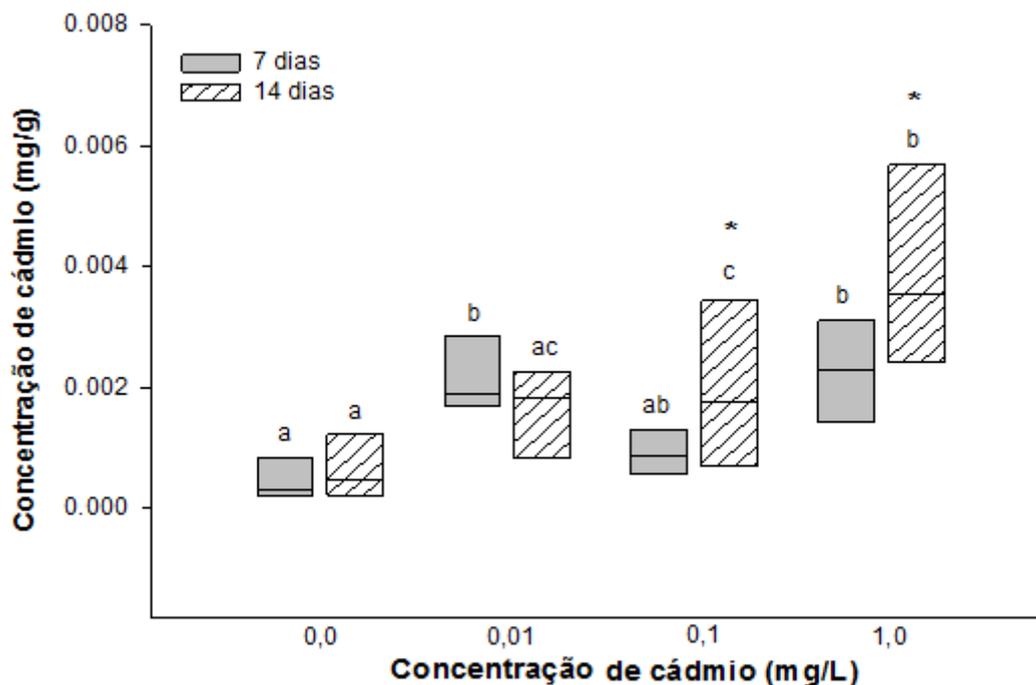


Figura 4 – Valores médios (mg/g) do acúmulo de cádmio pelas brânquias dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e os respectivos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos em mediana e erro padrão da mediana, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

4.7 Bioacumulação em Músculo Esquelético

De acordo com os dados analisados, observa-se que o acúmulo de cádmio no tecido muscular esquelético de indivíduos de *G. brasiliensis* exibe relação tempo-dependência ($p < 0,001$), na concentração mais elevada de cádmio, 1,0 mg/L, porém não foi observada relação dose-dependência (Figura 5).

No experimento de uma semana de duração, observa-se que o acúmulo de cádmio pelo tecido muscular esquelético não se difere significativamente entre os grupos experimentais expostos às três concentrações de cloreto de cádmio. Já no

experimento de duas semanas, é visto que ocorre um acúmulo maior de cádmio pelo tecido muscular no grupo exposto a concentração de 1,0 mg/L, apresentando diferença significativa quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 5).

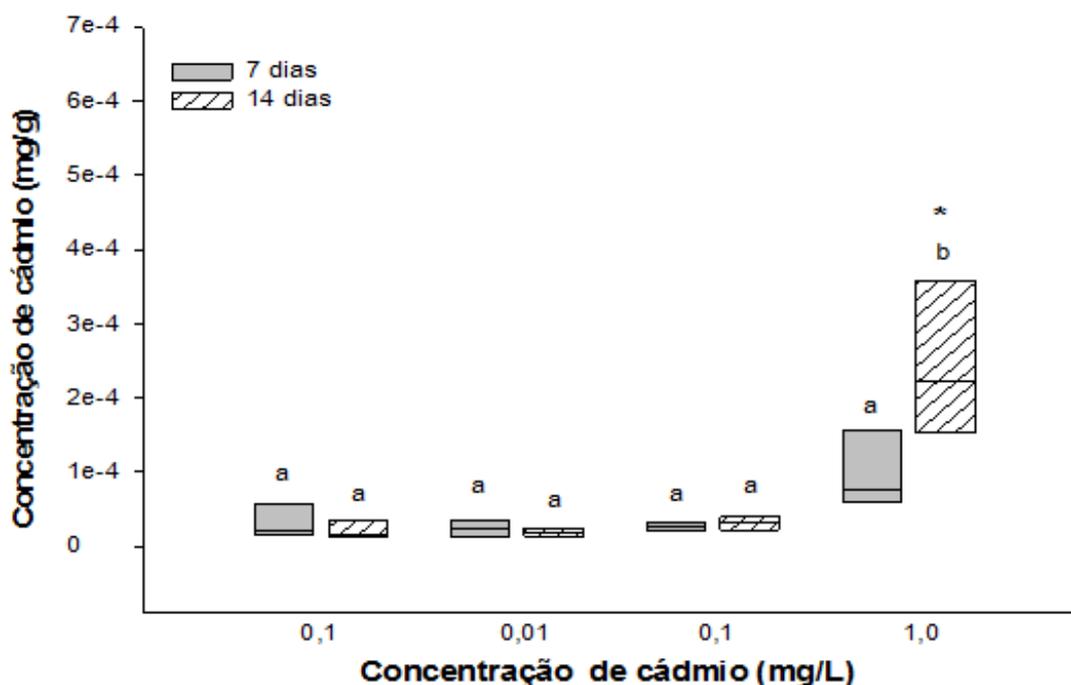


Figura 5 – Valores médios (mg/g) do acúmulo de cádmio pelo tecido muscular esquelético dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos em mediana, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos analisados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$). A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana.

4.8 Catalase (CAT)

Os dados obtidos mostram que não houve diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos experimentais em relação à atividade da enzima catalase (CAT) no fígado dos indivíduos expostos às concentrações

nominais de 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L de Cd em cada período de exposição (7 e 14 dias) (Figura 6).

Em relação ao tempo de exposição, pode-se observar diferenças significativas ($p \leq 0,001$) entre a exposição de 7 e 14 dias de duração. Visto que após 14 dias de exposição a atividade enzimática da CAT exibiu um aumento em todos os grupos expostos ao cádmio, exceto o grupo exposto a concentração de 0,01 mg/L, incluindo o grupo controle (Figura 6).

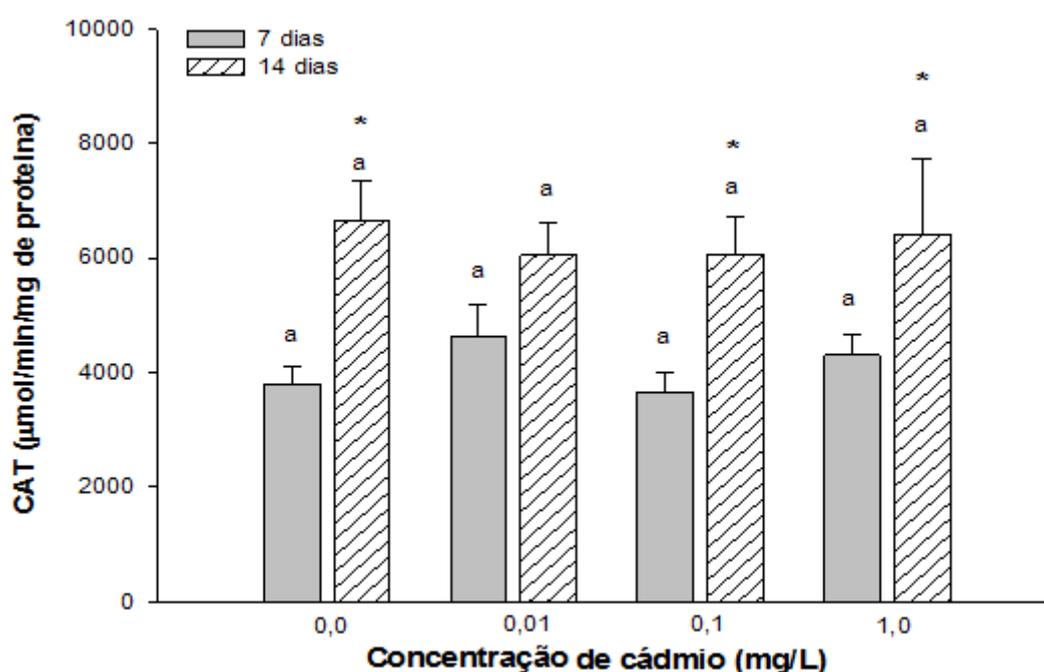


Figura 6 – Atividade enzimática da catalase (CAT) no fígado de exemplares de *Geophagus Brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de um mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$). * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$).

4.9 Glutathione-S-transferase (GST)

De acordo com os dados analisados, foi observado que não houve alterações significativas (diminuição ou aumento) na atividade enzimática da GST no fígado dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* em relação às concentrações nominais utilizadas de cádmio após a exposição de 7 dias de duração (Figura 7). Já após a exposição de 14 dias de duração, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade da enzima GST nos indivíduos expostos às concentrações nominais de 1,0 mg/L de cádmio (Figura 7).

O tempo de exposição também teve influência na atividade da enzima GST, visto que houve aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade dessa enzima nos indivíduos expostos a 1 mg/L de Cd após 14 dias, quando comparado aos indivíduos expostos a 1 mg/L após 7 dias (Figura 7).

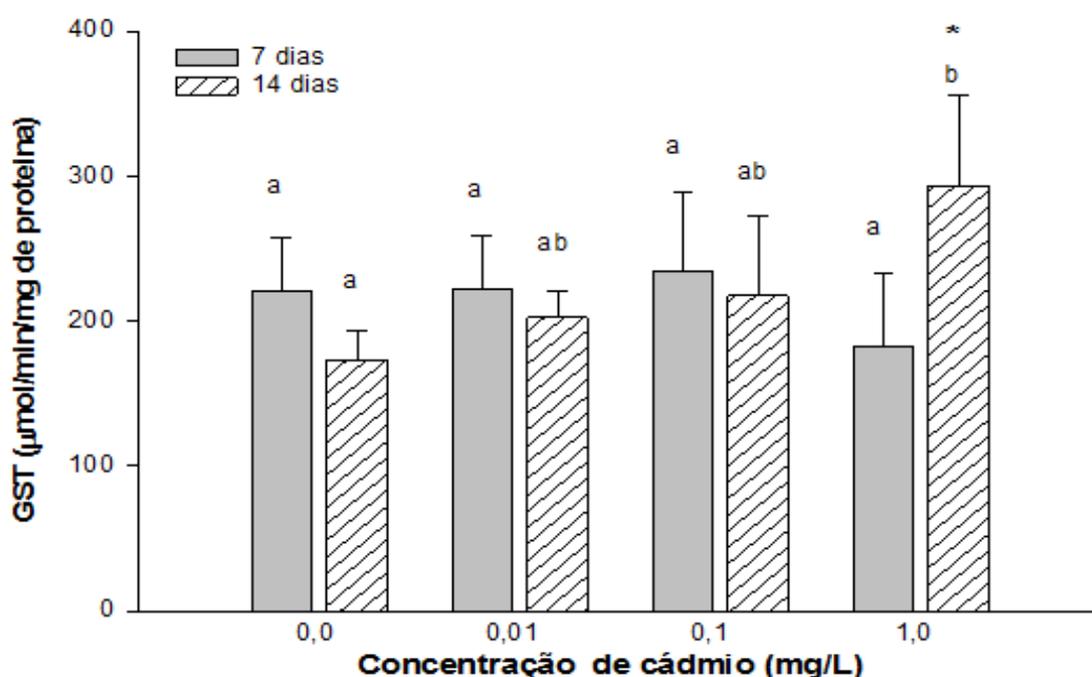


Figura 7 – Atividade enzimática da glutathione S-transferase no fígado de exemplares de *Geophagus brasiliensis* expostos a três concentrações nominais de cádmio: 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L, e seus respectivos grupos controles de cada período de exposição de 7 e 14 dias. Os valores são expressos como média e erro padrão da média, determinados pelo teste estatístico Two Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para determinar diferenças estatísticas entre os grupos analisados. * indica diferença significativa entre os tempos de exposição (7 e 14 dias) em uma mesma concentração ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

5.1 Índice hepatossomático

Sabe-se que o índice hepatossomático é capaz de oferecer uma indicação a respeito do estado de reserva de energia de um indivíduo por meio da avaliação do fígado (Furley e Perônico, 2015). De modo geral, os dados obtidos no presente estudo não indicam alterações conspícuas nesse índice em indivíduos de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de Cd durante 7 e 14 dias de exposição. Uma redução desse índice em peixes, normalmente, pode estar associada a uma menor quantidade de energia reservada nos organismos, que geralmente ocorrem em indivíduos que habitam ambientes pobres e com elevadas concentrações de cádmio na água, o que sugere que esse efeito seja uma consequência de uma exposição crônica dos organismos ao composto (Furley e Perônico, 2015).

5.2 Micronúcleo

Os resultados obtidos a partir do presente estudo não indicaram uma relação de dose-dependência e de tempo-dependência no aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos dos indivíduos de *Geophagus brasiliensis* expostos ao cádmio. Essa baixa incidência de micronúcleos em eritrócitos de *Geophagus brasiliensis* é similar à baixa incidência encontrada por Çavas et al. (2005), que também não observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Cyprinos carpio* após a exposição ao cádmio nas concentrações de 0,005 e 0,1 mg/L, durante 21 dias. Porém, no mesmo estudo foi observado um aumento significativo na frequência dos micronúcleos em peixes das espécies *Carassius gibelio* e *Corydoras paleatus* na exposição de 21 dias, à concentração de 0,1 mg/L de cloreto de cádmio.

Por outro lado, muitos trabalhos observaram aumento significativo da presença de micronúcleos eritrocitários em diversos organismos quando expostos ao cádmio (Çavas et al., 2005; Lewińska et al., 2007; Aramphongphan et al., 2009). De acordo com Jindal e Verma (2005), o aumento da frequência de micronúcleos

costuma ser notório entre o período de 24 e 96 horas, pois esse é o período mais provável que ocorra o processo de divisão celular, onde os micronúcleos podem ser formados através da exposição e indução por um agente xenobiótico.

No estudo de Ayllon e Garcia-Vazquez (2000), também foi visto uma baixa frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes da espécie *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna* que receberam doses intraperitoneal de cloreto de cádmio nas concentrações de 0,17 mg/Kg, 1,7 mg/Kg, 3,4 mg/Kg, por um período de 24 horas. Nepomuceno et al. (1997) também observaram uma baixa frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Cyprinus carpio* expostos a 2,0 mg/L de mercúrio durante 159 dias, sendo analisada a frequência em média a cada oito dias.

Essa baixa frequência de micronúcleos em eritrócitos encontrada nos trabalhos citados acima pode estar relacionada com a cinética celular ou até mesmo à substituição de células danificadas por outras saudáveis (Çavas et al., 2005). Baseado nos resultados do presente estudo e corroborado com as informações citadas por outros autores, observa-se que o cádmio pode oferecer um risco genotóxico menor para a espécie *Geophagus brasiliensis* quando expostas às concentrações de 0,01, 0,1, e 1,0 mg/L de Cd, ou possivelmente há uma pequena sensibilidade ao teste do micronúcleo quando comparado a outras espécies.

5.3 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica bastante utilizada para a detecção de fragmentos dos filamentos do DNA e é considerado um bom biomarcador não específico de genotoxicidade em espécies aquáticas e além disso, é considerada uma técnica sensível, de rápida execução e não muito custosa (Frenzilli et al., 2009; Pellegrini et al., 2014).

No presente estudo, foi observada uma significativa relação dose-dependência entre as concentrações utilizadas e os danos causados ao DNA. É visto que, o aumento do índice de danos ao DNA ocorre de forma significativa a partir da concentração de 0,1mg/L de Cd a 7 dias e 1,0mg/L a 14 dias. Embora não tenha ocorrido relação tempo-dependência, pode-se notar que, aos 14 dias de exposição, ocorre uma pequena diminuição no índice de danos causados ao DNA.

A relação dose-dependência observada no presente estudo é similar ao trabalho de Ahmed et al. (2010), que também notaram essa relação nos tecidos das brânquias, do fígado e do rim, ao expor indivíduos da espécie *Anabas testudineus* (Bloch) às concentrações de 0,1, 1,0 e 2,0 mg/L de Cd, durante 96 h. Assim como no trabalho de Ahmed et al. (2011), que notaram a relação dose-dependência nos tecidos de brânquia, fígado e sangue, em indivíduos de *Oreochromis mossambicus* expostos às concentrações de 3ppm, 28ppm e 56ppm de arsênio (NaAsO₂), durante 48h, 96h e 192 h. Os resultados obtidos no presente trabalho também são similares ao de Jindal e Verma (2015), que ao exporem indivíduos de *Labeo rohita* (Hamilton) às concentrações de 0,37mg/L e 0,62mg/L de Cd durante 100 dias, sendo as amostras de sangue coletadas em diferentes intervalos (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 e 100 dias), foi observado o aumento gradual de danos ao DNA em ambas concentrações, sendo observado o pico máximo de danos após 10 dias de exposição, seguida de uma diminuição dos danos a partir de 15 dias de exposição.

O aumento do índice de danos ao DNA pode estar relacionado à capacidade do Cd de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO's), o que, conseqüentemente, induz à quebra dos filamentos do DNA, uma vez que as ERO's podem induzir a peroxidação lipídica, atuando sobre a membrana plasmática ou sobre o DNA, causando danos diretos. Esses danos ao DNA também podem ser induzidos pela inibição do sistema de reparação (Ahmed et al., 2010; Rocha et al., 2014; Jindal e Verma, 2015). Os danos causados ao DNA são considerados graves, uma vez que a cadeia do DNA quebrada pode ser rearranjada em outra posição, alterando a ordem de suas bases. Sendo assim, esse evento pode ocasionar uma mutação, além disso, o acúmulo de bases danificadas pode arremeter a uma oncogênese (Barreiros et al., 2006; Zapata et al., 2016).

Em relação à pequena diminuição no índice de danos do DNA após 14 dias de exposição, pode ser explicada por uma possível reparação do DNA danificado. Também é visto que, uma exposição contínua, por um longo período, aos poluentes pode ocasionar em uma aclimatação dos indivíduos expostos, que conseqüentemente desenvolvem mecanismos de adaptativos capazes de tolerar o estresse oxidativo causado pelos poluentes (Jindal e Verma, 2015; Singh e Srivastava, 2010), ou devido à perda de células que foram severamente danificadas,

ou ambos (Ahmed et al., 2011). Além disso, pode ocorrer perda da concentração inicial e total das doses utilizadas no presente estudo (0,01, 0,1, 1,0mg/L), assim como também já ocorreu em trabalhos de outros autores, como o de Bucker et al (2006).

5.5 Acumulação de cádmio nos tecidos

A distribuição dos metais acumulados pelos organismos raramente ocorre de modo uniforme entre os tecidos. Essa diferença pode ocorrer devido ao tipo de exposição, que pode ser tanto via solução, quanto alimentar; concentração dos compostos metálicos e a duração da exposição a qual os organismos são expostos (Qu et al., 2014). De acordo com Kraal et al. (1997), é visto que o acúmulo dos metais nos órgãos dos peixes tendem a decrescer na seguinte ordem: intestino > brânquia > rim > fígado > músculo, desde que os indivíduos sejam expostos aos metais via solução hídrica. Essa descrição foi exatamente o que aconteceu no presente trabalho, visto que a brânquia acumulou concentrações mais elevadas de cádmio quando comparado ao músculo. Esse resultado é similar também ao trabalho de Qu et al. (2014), os quais expuseram indivíduos de *Carassius auratus* à concentração de 0,1 mg/L de cádmio nos períodos de tempo de 3 e 12 dias, sendo a brânquia o órgão que acumulou concentrações maiores de cádmio quando comparado a acumulação no músculo.

O maior acúmulo de cádmio pela brânquia pode ser explicado uma vez que esse órgão possui contato direto com o meio aquoso e, conseqüentemente, é o primeiro a entrar em contato com os íons de cádmio dissolvidos na água, esses íons podem se ligar de forma não específica aos mucopolissacarídeos (composto de mucoproteínas com glicoproteínas), encontrados externamente ao tecido branquial. Portanto, a brânquia pode ser o primeiro alvo passível a acumulação antes que o cádmio seja distribuído para outros órgãos (Isani et al., 2009; Qu et al., 2014).

Pode-se ainda notar no presente estudo que o acúmulo de cádmio na brânquia tem relação de dependência com a duração do tempo de exposição, sendo maior após 14 dias de exposição. O resultado encontrado, é similar ao de Isani et al. (2009), quando indivíduos da espécie *Sparus aurata* foram expostos à concentração

de 0,1 mg/L de cádmio via solução hídrica (água salgada) durante 4 e 11 dias, onde foi observado o efeito do tempo no acúmulo do metal, sendo a acumulação pela brânquia, significativamente, maior após a exposição de 11 dias. Os dados do presente trabalho também são corroborados pelo estudo de Souid et al. (2013), onde indivíduos de *Sparus aurata* foram expostos à concentração de 0,5 mg/L de cádmio no período de 2h, 4h e 24h, sendo essa acumulação maior após a exposição de 24 h, tanto para as brânquias quanto para o músculo.

Já em relação ao acúmulo de cádmio no tecido muscular, houve relação de tempo-dependência, sendo maior após 14 dias de exposição. Também é notável que a acumulação do metal foi maior em indivíduos expostos a concentração de 1,0 mg/L de cádmio em ambos tempos de exposição.

Esse resultado de tempo-dependência é similar ao de Wu et al. (2007), os quais expuseram indivíduos de *Oreochomis sp.* (tilápia) a 4,45 μ M de cádmio pelo período de 0 h, 5 h, 5 dias e 15 dias. De acordo com esse trabalho citado acima, foi visto que, embora o músculo acumule menores concentrações de cádmio quando comparado a outros órgãos (brânquias, intestino, rim e fígado), o acúmulo desse metal pode ser mais elevado nesse órgão após uma exposição de longa duração (15 dias). A menor acumulação de cádmio pelo tecido muscular quando comparado ao da brânquia pode ser explicado pelo fato de que o tecido muscular representa uma maior fração de tecido em relação ao peso total do peixe. Portanto, é visto que o cádmio acumulado nesse tecido pode ter sofrido uma diluição em uma massa total maior do que em um órgão como a brânquia (Liang et al., 2012).

De acordo com a portaria 658 de 1998 (ANVISA), o nível máximo de cádmio permitido nos peixes e pescados é de 1,0 mg/ kg. Embora a concentração de cádmio encontrado no músculo dos peixes do presente estudo tenha sido baixa, deve ser levado em consideração que grande parte dos organismos além de serem passíveis a bioacumulação, também são passíveis a biomagnificação dos metais. Portanto, deve ser levada em consideração a qualidade do ambiente em que os peixes se encontram, uma vez que alimentos com elevadas concentrações de cádmio podem oferecer risco a saúde humana e a saúde da biota aquática.

5.6 Atividade da enzima catalase (CAT)

A enzima CAT é considerada uma enzima de defesa primária, responsável por catalisar o peróxido de hidrogênio em hidrogênio e água, uma forma não tóxica (Qu et al., 2014). No presente trabalho, a atividade da enzima catalase não apresentou diferenças significativas nas exposições de 7 e 14 dias relacionadas as diferentes concentrações utilizadas.

Esse resultado é similar ao de Atli e Canli. (2010), que ao exporem indivíduos de *Oreochromis niloticus* a 20 µM de Cd, pelo período de 20 dias, observaram que a atividade da CAT no fígado dos indivíduos não apresentou alterações significativas quando comparada com o grupo controle. E também ao de Jin et al. (2015), que ao exporem larvas de *Danio rerio* às concentrações de 1, 3 e 10 µM de Cd, por 96 h, observaram que não houve um aumento significativo da atividade da CAT nos grupos tratados em todas às concentrações.

Em relação ao tempo de exposição, foi observado que a atividade enzimática se elevou nos grupos expostos às concentrações de 0,1 e 1,0 mg/L de Cd após 14 dias de exposição, essa alteração pode ter sido induzida pelo metal. Esse resultado é similar ao encontrado por Basha e Rani (2003), o qual mostra que o aumento significativo da atividade da enzima CAT pode ocorrer no fígado de indivíduos de *Oreochromis mossambicus* (Tilápia) exposto a elevada dose de Cd após a exposição de 7 e 15 dias. Dessa forma, o resultado do presente estudo indica uma possível mudança em direção a um mecanismo de desintoxicação sob a exposição em longo prazo para o Cd.

Em relação ao grupo controle, foi visto um aumento da atividade da enzima após a exposição de 14 dias quando comparado com a exposição de 7 dias, sabe-se que atividades relacionadas as enzimas antioxidantes podem sofrer variações em organismos em relação ao sexo, idade e estado nutricional, assim como o próprio manejo dos indivíduos durante o período experimental, mesmo que não haja a presença de poluentes na água. De forma que esse resultado pode estar relacionado a outros fatores que impliquem um estresse ao organismo (Camargo, 2002).

5.7 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

A GST é uma importante enzima de detoxificação, uma vez que catalisam a conjugação de substâncias xenobióticas com a glutathione (GSH), com a finalidade de tornar os poluentes mais hidrófilos para o transporte ou excreção (Kaur e Kaur, 2015). Os dados obtidos no presente estudo mostram que o aumento na atividade da enzima GST é conspícua apenas em indivíduos expostos à concentração nominal de 1,0 mg/L de Cd quando comparado ao seu grupo controle, após a exposição de 14 dias de duração. Também é possível observar diferença significativa entre os tempos de exposição, o qual mostra que os indivíduos expostos à concentração nominal de 1,0 mg/L de Cd apresenta a atividade da GST mais elevada após a exposição de 14 dias de duração quando comparada com a atividade dos indivíduos expostos a mesma concentração após a exposição de 7 dias de duração.

Esses resultados são similares ao trabalho de Basha e Rani (2003), o qual mostra que elevações significativas da atividade das enzimas GST podem ocorrer no fígado de indivíduos de *Oreochromis mossambicus* (Tilápia) expostos a elevada dose de Cd (5 mg/L), após a exposição de 7 dias em diante e pode ser mantido até 15 dias. Assim como no trabalho de Zirong e Shijun (2007), onde foi observado o aumento da atividade da GST no fígado em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 3 mg/L de Cd, pelo período de 1, 5, 10, 20 e 40 dias, é possível notar um aumento significativo na atividade da enzima quando comparada com o grupo controle a partir do quinto dia de exposição.

Sabe-se que o aumento da enzima glutathione S-transferase pode estar associado ao estresse oxidativo e ao mecanismo de detoxificação dos organismos, induzidos por metais, do contrário não ocorreriam alterações na atividade dessa enzima (Basha e Rani., 2003; Atli et al., 2006). De acordo com os dados da enzima GST obtidos no presente estudo, sugere-se que em indivíduos de *Geophagus brasiliensis*, o aumento da atividade da GST no fígado mostra uma possível mudança em direção a um mecanismo de desintoxicação sob a exposição em longo prazo para o Cd, essa mudança na atividade dessa enzima é um processo esperado devido ao papel efetivo do fígado na desintoxicação de xenobióticos (Basha e Rani, 2003).

5. CONCLUSÕES

O cádmio possui um baixo poder mutagênico em eritrócitos de indivíduos de *Geophagus brasiliensis* nas concentrações e tempo testados, observados por meio do teste do micronúcleo.

O Ensaio cometa, por sua vez, quando comparado ao teste do micronúcleo, se mostrou mais eficiente e sensível em detectar efeitos genotóxicos do Cd nos indivíduos quando expostos a diferentes concentrações.

Em relação ao acúmulo de Cd foi observado que o tempo de exposição exerce uma grande influência sobre a bioacumulação desse metal tanto das brânquias quanto dos músculos, sendo encontradas maiores concentrações de Cd nos órgãos dos indivíduos expostos durante o período de 14 dias. Também foi demonstrado que a concentração do Cd influencia no acúmulo dos compostos pelos organismos.

O Cd é capaz de provocar ativação das enzimas glutathione S-transferase e da catalase como mecanismo de desintoxicação ao xenobiótico, após os indivíduos serem expostos a maiores concentrações de cádmio aos 14 dias para GST e em relação ao maior período de tempo para ambos.

De modo geral, a concentração máxima de cádmio para águas de classe III determinada pela Resolução CONAMA 357/2005 não ofereceu grande risco genotóxico, mutagênico e oxidativo nos organismos-alvo do estudo. Embora os indivíduos tenham bioacumulado baixas concentrações de Cd no músculo, ainda assim, é necessário um controle maior da qualidade dos ambientes, tendo em vista o potencial efeito de biomagnificação dos compostos químicos e os potenciais riscos à saúde humana e animal devido ao consumo de organismos aquáticos contaminados. É necessário o constante monitoramento das concentrações de metais na água, assim como avaliar periodicamente a concentração desses compostos nos organismos, para que se possa ter uma caracterização da qualidade do ambiente no qual se encontram.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências seguem as normas da revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Abelha, M.C.F., Goulart, E. 2004. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum/ Biological Sciences*. 26, 37-45.

Adams, S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society Bethesda, Maryland. pp 13-14.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105, 121-6.

Ahmed, H., Parvin, E., Arif, M., Khan, M.S., Islam, M. 2010. Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. *Environ Toxicol Pharmacol*. 30, 80-84.

Ahmed, H., Al-Mamun, H., Hossain, A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*. 84, 143–149.

Al-Asgah, N.A., Abdel-Wahab., A., Abdel-Warith, El-Sayed, Younis, M., Hassan, Allam, Y. 2015. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. *Saudi. J. Biol. Sci*. 22, 543-550.

Andrade, V.M., Freitas, T.R.O., Silva, J. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res*. 560, 57-67.

ANVISA, 1998 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 658 de 27/08/1998. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de ago.

Apha, (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, New York, ed 18, 1050.

Atli, G., Alptekin, O., Tukul, S., Canli, M. 2006 Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Toxicol. Pharmacol. 143, 218-224.

Aramphongphan, A., Laovitthayangoon, S., Himakoun, L. 2009. Snakehead-fish cell line, SSN-1 (*Ophicephalus striatus*) as a model for cadmium genotoxicity testing. Toxicol. in Vitro. 23, 965-968.

Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciênc. saúde colet. 12, 61-72.

Ayllon, F., Garcia-Vaquez, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. Mutat. Res, 467(2): 177-186.

Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Medeiros, De.M. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 320-325.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quím. Nova (online). 29, 113-123.

Basha, P.S., Rani, A.U. 2002. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 218-221.

Bhagure, G.R., Mirgane, S.R. 2011. Heavy metal concentrations in groundwaters and soils of Thane Region of Maharashtra, India. Environ. Monit. Assess. 173, 643-652.

Book, M.V., Machado Neto, J.G. 2005. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxiclreto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata*. B. Inst. Pesca. 31, 29.

Bücker, A., Carvalho, W., Alvez-Gomes, J.A. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmania virencens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. Acta Amaz. 36, 357-364.

Camargo M.M.P. 2002. Biomarcadores funcionais de curimbas, *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes in situ no alto ribeirão Cambé, Londrina, PR. Monografia de bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

Carmo, C.A., Abessa, D.M.S., Neto, J.G.M. 2011. Metais em águas, sedimentos e peixes coletados no estuário de São Vicente-SP, Brasil. Mundo Saúde (online). 35, 64-70.

Carvalho-Neta, R.N.F., Abreu-Silva, A.L. 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes:Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. Lat. Am. J. Aquat. Res. 41, 217-225.

Çavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V. 2005. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and cooper sulphate. Food. Chem. Toxicol. 43, 569–574.

Cheng, F., Gao, J., Zhou, Q. 2011. Toxicity assessment of simulated urban runoff containing polycyclic musks and cadmium in *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. Environ. Pollut. 162, 91- 97.

Collins, A., Dusinská, M., Franklin, M., Somorosvská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslová, K., Vaughan, N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ. Mol. Mutagen. 30, 139–146.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente.

Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. Disponível em:<
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> > Acessado em:
Fevereiro/2015.

Dangre, A.J., Manning, S., Brouwer, M. 2010. Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Aquat. Toxicol.* 99, 168–175.

EPA. 1992. Agência de Proteção Ambiental Norte Americana. Acid digestion of aqueous samples and extracts for total metals for analysis by gfaa spectroscopy, Method 3020A.

Freire, M.M., Santos, V.G., Ginuino, I.S.F., Arias, A.R.L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12, 347-354.

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.*, 681, 80-92.

Furley, T.H., Perônico, C. 2015. Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos. Instituto Aplysia, p. 50.

Grazeffe, V.S.; Tallarico, I.F., Pinheiro, A.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A.B., Nakano, E. 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat. Res.* 654, 58-63.

Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet. Mol. Biol.* 23, 235-239.

Habig, W.H., Jakoby, M.J. 1981. Assays for differentiation of glutathione s-transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398-405.

Habig, W.J., Pabst, M.J., Jacoby, W.B. 1974. Glutathione s-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpené, E., Falcioni, G. 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 224-230.

Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. pp. 319-368.

Jindal, R., Verma, S. 2015. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 1–10.

Jin, Y., Liu, Z., Liu, F., Ye, Y., Peng, T., Fu, Z. 2015. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 9-17.

Kaur, S., Kaur, A. 2015. Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). *Toxicol. Pharmacol.* 167, 108-116.

Keeling, P.L., Smith, L.L. 1982. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3243-3249.

Kraal, M.H., Kraak, M.H., Groot, C.J., Davids, C. 1995. Uptake and Tissue Distribution of Dietary and Aqueous Cadmium by Carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 179-183.

Lewińska, D., Arkusz, J., Stańczyk, M., Palus, J., Dziubałtowska, E., Stepnik, M. 2007. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a)pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 632, 37-43

Li, L., Zheng, B., Liu, L. 2010. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends. *Procedia. Environ. Sci.* 2, 1510–1524.

Liang, C., Xiujuan, S., Ye, Z., Dou, S. 2012. Tissue specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 16-25.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1, 265-75.

Maceda-Veiga, A., Monroy, M., Navarro, E., Viscor, G., Sostoa, A. 2013. Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river. *Sci. Total. Environ.* 449, 9–19.

- Magalhães, D.P., Filho, A.S.F. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12, 355-381.
- Morgano, M.A., Rabonato, L.C., Milani, R.F., Miyagusku, L., Balian, S.C. 2011. Assessment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). *Food Control.* 22, 778-785.
- Moraes, D.S.L., Jordão, B.Q. 2002. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Rev. Saude Publica.* 36, 370-374.
- Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Spanó, M.A., Centeno, A.J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus Carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30:293 –297.
- Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., Rantin, F.T. 2001. The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Braz. J. Biol.* 61, 547-554.
- Pellegrini, V., Gorbi, G., Buschini, A. 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. *Aquat. Toxicol.* 155: 261-268.
- Qu, R., Wang, X., Wang, Z., Wei, Z., Wang, L. 2014. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *J. Hazard. Mater.* 275, 89-98.
- Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J. 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 29-37.
- Singh, N.N., Srivastava, A.K. 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. *Ecotoxicology.* 19, 838–854.
- Silva, J.A.L. 2013. A etimologia de biomoléculas com metais de transição como auxiliar na aprendizagem de Química Biológica. *Quim. Nova.* 36, 1458-1463.

- Souid, G., Souayed, N., Yaktiti, F., Maaroufi, K. 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 1-7.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-22.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201-204.
- Vannucchi, H., Moreira, E.A.M., Bernardes, M.M. 1998. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e na defesa antioxidante. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 31, 31-44.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesement: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vieira, F., Gasparini, J.L., Macieira, R.M. 2014. Guia ilustrado dos peixes da bacia do rio Benevente – ES. ACQUA Consultoria e Recuperação de Ambientes Aquáticos Ltda/São Joaquim Energia S.A., Vitória. 100p. ilustr.
- Virga, R.H.P. Geraldo, L.P. Santos F.H. 2007. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27, 779-785.
- Wu, S.M., Shih M.J., Ho, Y.C. 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145 (2007), pp. 218–226.
- Zapata, L.M., Bock, B.C., Orozco, L.Y., Palacio, J.A. 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for *in situ* genotoxic monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127, 108-116.
- Zirong, X., Shijun, B. 2007. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 98-94.