

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

**BIOACUMULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *Geophagus*  
*brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) EXPOSTOS A ALIMENTOS  
CONTAMINADOS COM CHUMBO EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

**JULIA MERÇON FERNANDES MOREIRA**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/2017**

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

**BIOACUMULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *Geophagus*  
*brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824) EXPOSTOS A ALIMENTOS  
CONTAMINADOS COM CHUMBO EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

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

**JULIA MERÇON FERNANDES MOREIRA**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/2017**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M88b      Moreira, Julia Merçon Fernandes  
              Bioacumulação e estresse oxidativo em *Geophagus  
              brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) expostos a alimentos  
              contaminados com chumbo em diferentes temperaturas / Julia  
              Merçon Fernandes Moreira – 2017.  
              52f.: il.

              Orientador: Levy de Carvalho Gomes.  
              Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -  
              Universidade Vila Velha, 2017.  
              Inclui bibliografias.

              1. Ecologia. 2. Alimentos - Contaminação. 3. Chumbo.  
              I. Gomes, Levy de Carvalho. II. Universidade Vila Velha.  
              III. Título.

CDD 577

**JULIA MERÇON FERNANDES MOREIRA**

**BIOACUMULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *Geophagus  
brasilensis* (Quoy & Gaimard, 1824) EXPOSTOS A ALIMENTOS  
CONTAMINADOS COM CHUMBO EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2017

Banca examinadora



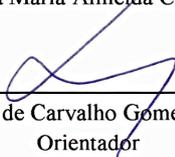
---

Dr. Maik dos Santos Cividanes da Hora – UFES



---

Dra. Zilma Maria Almeida Cruz - UVV



---

Dr. Levy de Carvalho Gomes – UVV  
Orientador

Dedico à minha família, minha mãe Maria José Fernandes e às minhas tias, que mesmo diante de todas as dificuldades sempre me apoiaram ao longo do meu estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, minha mãe e minhas tias que, perante todas as dificuldades, sempre me apoiaram a seguir com meus estudos e com minha vontade de me especializar na área que escolhi para a vida.

Ao Dr. Levy de Carvalho Gomes, por ter me aceitado como sua orientada. Pela paciência em me lapidar como pesquisadora e pelos ensinamentos oferecidos sempre de bom grado. Pelo seu incentivo e pelo seu apoio durante todo o desenvolvimento do meu mestrado e pelos conselhos e oportunidades oferecidas. Meu muito obrigada.

À minha grande amiga Tatiana Miura Pereira que, com toda a sua ansiedade, me ajudou nesse percurso tão sonhado por nós duas. Crescemos juntas, como parceiras de trabalho e de vida. Foram dez anos de amizade encurtados em dois. Meu muito obrigada pela consideração, disposição, parceria, carinho e dedicação que você teve a mim e ao meu projeto.

Aos amigos Taciana, Larissa, Dandara e Gabriel por terem formado comigo o melhor time. Muito obrigada pelos risos e sorrisos oferecidos todos os dias dentro do laboratório. Muito obrigada pelos ensinamentos e lições de vida que, mesmo sem saberem, me deram. Obrigada pela paciência e pela persistência em estarem comigo por todo esse caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudos para o desenvolvimento do projeto e sua execução.

Agradeço, também, aos professores do curso pelos ensinamentos, a paciência, o apoio e a dedicação a mim fornecidos ao longo do curso.

## LISTA DE FIGURAS

**Tabela 1.** Concentração de chumbo na água dos aquários expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

**Figura 1.** Concentração de chumbo no fígado (A), na brânquia (B), no intestino (C) e no músculo (D) de indivíduos adultos de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo /kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

**Figura 2.** A) Atividade da enzima Catalase (CAT) nas brânquias de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C; B) Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) nas brânquias de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco

(\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

**Figura 3.** A) Atividade da enzima Catalase (CAT) no músculo de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C; B) Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) no músculo de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

**Figura 4.** Frequência de danos genotóxicos no sangue de indivíduos adultos de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo /kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo /kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo /kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

## SUMÁRIO

<b>1. EMBASAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Contaminação do ecossistema de água doce por chumbo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Contaminação por chumbo e seus efeitos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Aumento da temperatura da água e seus efeitos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Biomarcadores.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5. <i>Geophagus brasiliensis</i> como bioindicador.....</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Aclimação e desenho experimental.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Concentração de chumbo nos tecidos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Estresse oxidativo .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1. Proteínas totais .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2. Catalase .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.3. Glutathione-S-Transferase .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Efeitos genotóxicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Análises estatísticas .....</b>	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Análise de chumbo na ração e na água.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Concentração de chumbo no tecido.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Estresse oxidativo .....</b>	<b>21</b>

4.3.1.	Atividade enzimática nas brânquias .....	21
4.3.2.	Atividade enzimática no músculo .....	23
4.4.	Efeitos genotóxicos .....	25
5.	DISCUSSÃO .....	27
6.	REFERÊNCIAS .....	31

## RESUMO

Merçon, Julia, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2017.

### **Bioacumulação e estresse oxidativo em *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) expostos a alimentos contaminados com chumbo em diferentes temperaturas**

Orientador: Dr. Levy de Carvalho Gomes.

A ocorrência de chumbo nos lixiviados de indústrias é de grande interesse por estarem presentes em grandes quantidades e serem constantemente descarregados em ambientes aquáticos. Os efeitos deletérios do chumbo podem ser agravados por variantes ambientais, como a temperatura da água. No Brasil, a variação da temperatura da água é elevada, com isso, populações de espécies de ampla distribuição geográfica como *Geophagus brasiliensis* vivem em águas com diferentes temperaturas médias. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o estresse oxidativo e a bioacumulação de chumbo em *Geophagus brasiliensis* expostos a diferentes temperaturas e alimentados com ração contendo 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração. Trinta e dois juvenis de *G. brasiliensis* foram expostos ao chumbo por via alimentar, em concentrações nominais de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração em duas diferentes temperaturas (25 e 28°C), totalizando 4 tratamentos (25/0, 25/60, 28/0 e 28/60). Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial contendo as concentrações específicas de chumbo, na taxa de 1,5% do peso vivo. Foram realizadas as análises de estresse oxidativo, bioacumulação e danos genotóxicos. A contagem de micronúcleo foi significativamente maior no tratamento 25/60 quando comparado ao tratamento 25/0 e ao tratamento 28/60. As brânquias e o fígado apresentaram um aumento significativo na concentração de chumbo, nos peixes alimentados com 60 mg de chumbo/kg de ração. A atividade das enzimas Catalase e GST, nas brânquias, responderam de forma similar ao acúmulo do chumbo, com um aumento nos peixes expostos ao tratamento 25/60. No intestino e no músculo, foi

observado um aumento na concentração de chumbo nos peixes expostos ao tratamento 25/60 quando comparado aos peixes expostos ao tratamento 25/0. O fato de *G. brasiliensis* possuir uma grande distribuição geográfica expõe as populações da espécie a diferentes variações de temperatura. Assim, diferentes populações estão sujeitas a diferentes impactos na ingestão do chumbo. Sendo assim, temperaturas mais altas pode ser um fator benéfico aos peixes contaminados por chumbo pois pode dificultar a absorção e metabolização do metal e facilitar a excreção, diminuindo os danos causados no organismo.

**Palavras Chaves:** Acará; contaminação; dieta; enzimas; micronúcleo.

## ABSTRACT

Merçon, Julia, M.Sc., Vila Velha University – ES, 2017 february. **Bioaccumulation and oxidative stress in *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) exposed to lead contaminated food in different temperatures.** Advisor: Dr Levy de Carvalho Gomes.

The occurrence of lead in industrial leachates is of great interest because they are present in large quantities and are constantly discharged in aquatic environments. The deleterious effects of lead can be aggravated by environmental variants such as water temperature. In Brazil, water temperature has great variation, but species like *Geophagus brasiliensis* has a resistance to such variations, since it is present throughout the country. Despite resistance to temperature variation, the increase in temperature can cause some physiological imbalances in fish. Thirty two juveniles of *G. brasiliensis* were exposed to lead, at nominal concentrations of 0 and 60 mg of lead/kg of food X two temperature conditions (25 and 28 ° C), totalizing 4 treatments. The animals were fed daily with commercial food containing the specific concentrations of lead at the rate of 1.5% of live weight. Analyzes of oxidative stress, bioaccumulation and genotoxic damage were carried out, besides the presence of lead in the water of each treatment. The treatment exposed to temperature of 25°C and concentration of 60 mg of lead/kg of food was the one that presented the biggest change between all analyzes. The water and micronucleus analyzes showed a higher incidence of lead in the same treatment and when comparing the temperatures of 25 and 28°C, in relation to the concentration of 60 mg of lead/kg of food. The gills and liver showed an increase in bioaccumulation in treatments exposed to 60 mg of lead/kg of food, with no relation to temperature, although individuals at 25°C bioaccumulated the lead in greater quantity. The activity rate of the enzymes Catalase and GST in the gills increased proportionally to the

bioaccumulation of lead, being more intense in organisms exposed to water at 25°C. Intestine and muscle, showed an increase in lead bioaccumulation only at 25°C, when the two concentrations were compared. The increase in the activity rate of the GST enzyme was directly proportional to the increased bioaccumulation of lead in the muscle at the respective temperatures. The increased bioaccumulation of lead in individuals at 25°C can be justified by the increased metabolism of fish, when exposed to higher temperatures, feeding faster and increasing its ability to excrete the metal. In addition, at lower temperatures, there is a greater availability of oxygen, increasing the production of ROS and, consequently, the enzymes responsible for its elimination. The fact that *G. brasiliensis* has a large geographic distribution expose the specie's populations to different ranges of temperature. Therefore, different populations are submitted to different impacts of lead ingestion. That said, higher temperatures could be a benefic factor to lead contaminated fishes because it can interfere in metal absorption and metabolization in addition to facilitate excretion, decreasing damage in the organisms tissues.

**Key words:** Acara; contamination; diet; enzyme; micronucleus.

## **1. EMBASAMENTO TEÓRICO**

### **1.1. Contaminação do ecossistema de água doce por chumbo**

O chumbo é um metal não essencial que ocorre naturalmente na natureza (Van der Oost et al., 2003). As propriedades físico-químicas do chumbo como a maleabilidade, a baixa condutividade e a resistência à corrosão, favoreceram o uso do mesmo para uma variedade de aplicações. Os Romanos foram os primeiros a utilizar o chumbo na fabricação de canos para fornecimento de água e até como tinta. Devido à grande utilização em encanamentos, construção de barcos e janelas, indústria de armas e impressão de livros, o envenenamento por chumbo teve um alto índice de ocorrência entre os séculos XVI e XIX. Atualmente, a frequência da utilização do chumbo diminuiu, se comparada aos períodos passados. A epidemia de intoxicação por chumbo no mundo da industrialização levou a ações preventivas como a criação de leis para diminuição do uso do metal. Porém, o chumbo ainda é utilizado, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Hernberg, 2000). As elevadas concentrações presentes no ambiente hoje, são resultados de ações antrópicas como os lixiviados de indústrias, efluentes domésticos, de mineração e de agricultura (Van der Oost et al., 2003; Karbassi et al., 2006) que são constantemente descarregados nos ambientes aquáticos (Chen et al., 2016). Por não serem biodegradáveis, tendem a se acumular nos organismos vivos podendo causar diversas doenças (Bailey et al., 1999), se tornando prejudicial aos animais até mesmo em pequenas concentrações (Shah, 2006) e afetando negativamente a reprodução, o crescimento e o comportamento de peixes. Em altas concentrações, pode causar atrofia muscular, dormência, degeneração caudal, hiperatividade, natação errática, perda de equilíbrio em peixes (Burden et al., 1998), danos em quase todos os órgãos, no sistema nervoso central, rins e sangue, podendo ser fatal (Tong et al., 2000; Palaniappan et al., 2008). A ocorrência do chumbo nos

ambientes aquáticos é de grande interesse, pois são inevitavelmente transferidos por meio da cadeia trófica, podendo afetar os humanos e suas gerações (Bailey et al., 1999), já que os íons metálicos são tóxicos e carcinogênicos (Farombi et al., 2007). Uma vez no ecossistema aquático, o chumbo pode se misturar às partículas e formar complexos inorgânicos insolúveis ou permanecer dissolvidos. No caso de formar complexos insolúveis, a maior parte da fração irá sedimentar e pode voltar à coluna d'água por meio de vários mecanismos como alterações nos parâmetros físico-químicos da água e atividades biológicas e microbiológicas. Quando dissolvido, o chumbo pode permanecer como íons livres, ligar-se a complexos inorgânicos dissolvidos ou dissolver-se na matéria orgânica (Couture e Pyle, 2012).

## **1.2. Contaminação por chumbo e seus efeitos**

Os peixes acumulam metais por meio de duas vias de contaminação: o contato direto com a água, por meio das brânquias e da pele, e pela ingestão, por meio das rotas dietéticas (Van der Oost et al., 2003; Couture e Pyle, 2012). Anteriormente, a ecotoxicologia assumia que as concentrações dos metais na água eram preditores suficientes de toxicidade. Porém, de acordo com Chapman e Wang (2000) e Meyer et al. (2005), existem evidências de que ignorar a captação de metais via dieta, acabaria subestimando o acúmulo dos metais e seus riscos. Ainda assim, estabelecer os riscos oferecidos pelas duas vias de captação depende de vários fatores: para os embriões não alimentados, a água é a única fonte de acúmulo de metais; para os piscívoros grandes, o acúmulo de metais é maior pois estes se alimentam de pequenos peixes e porções variáveis de bentos e zooplânctons; no caso das pequenas espécies ou juvenis, o acúmulo provém, somente, de algumas fontes em potencial, como os próprios embriões ou os embriões de outras espécies. Isso resulta em níveis de bioacumulação diferentes para as diferentes fases de vida do organismo.

Em comparação com os metais provenientes da água, aos quais os peixes estão constantemente expostos, o acúmulo dos metais via dieta depende da quantidade e da proporção do consumo do alimento. A eficiência da transferência trófica dos metais entre os peixes e o alimento depende de alguns fatores, incluindo as taxas de consumo e eliminação, a fisiologia digestiva do peixe, o tempo de permanência da comida no intestino e a quantidade de metal disponível no alimento (Wallace e Luoma, 2003; Lapointe e Couture, 2010). Quando internalizados pelas presas, os metais podem ficar disponíveis (quando estão ligados a frações proteicas e organelas) ou indisponíveis para serem transportados pela cadeia trófica (quando ligados a grânulos inorgânicos). O potencial trófico do metal ingerido, vai depender da partícula a qual ele se liga e de sua digestibilidade (Wallace e Luoma, 2003), determinando se estes metais serão transferidos aos predadores e qual será a quantidade disponível para tal. De acordo com Lushchak (2011), essa bioacumulação do chumbo pode causar diversos efeitos nocivos ao organismo, como o estresse oxidativo e efeitos genotóxicos.

Os organismos aeróbicos usam a molécula de oxigênio para respiração e oxidação de nutrientes, formando espécies reativas de oxigênio (ERO's), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que são tóxicas aos organismos podendo atingir lipídeos, proteínas e o DNA. A interação das ERO's com os lipídeos é um dos danos celulares predominantes pois a peroxidação lipídica na mitocôndria é citotóxica, com efeitos nas atividades enzimáticas e produção de ATP, assim como o início de apoptoses. A interação com as proteínas resulta na fragmentação da cadeia peptídica e no aumento da suscetibilidade de remoção e degradação da cadeia. O acúmulo dessas proteínas na célula é, possivelmente, a responsável pelo processo de envelhecimento. A produção de ERO's também pode induzir inúmeras lesões no DNA que pode causar deleções, mutações e outros efeitos genéticos letais (Imlay, 2003). A fim de diminuir os efeitos

causados pelas ERO's, os organismos desenvolveram um mecanismo de defesa contra esses compostos, que são enzimas de cadeia respiratória associadas à membrana. A função dessas enzimas é catalisar as ERO's transformando-as em compostos não tóxicos (Cabiscol et al., 2000; Lushchak, 2011). Quando a formação das ERO's é maior do que a capacidade do organismo de catalisá-las, ocorre o estresse oxidativo (Cabiscol et al., 2000), que pode danificar os tecidos, aumentar a inflamação, aumentar a chance de desenvolver doenças e o envelhecimento (Sohal et al., 2002).

Segundo Cestari et al. (2004), a exposição ao chumbo também, causa aberrações cromossômicas e esses efeitos podem estar relacionados com a interferência do metal nos mecanismos de replicação, transcrição e reparação do DNA. Partes desses efeitos nos cromossomos, podem estar relacionados com a capacidade de interação do chumbo com proteínas estruturais que podem afetar os graus de condensação cromossômica. Dessa forma, a análise de micronúcleo se torna essencial para determinação dos efeitos deletérios do chumbo, a nível cromossômico (Monteiro et al., 2011).

### **1.3. Aumento da temperatura da água e seus efeitos**

Os ambientes de água doce são mais vulneráveis à mudança de temperatura porque são relativamente isolados e fisicamente fragmentados (Woodward et al., 2009). Como a contaminação por chumbo, o aumento da temperatura também intensifica a formação de ERO's, provocando o estresse oxidativo (Lushchak, 2011). Porém, o efeito da temperatura nas propriedades estruturais das enzimas reflete fatores de adaptações bioquímicas, nos peixes (Hochachka e Somero, 1968). Os processos físico-químicos dos peixes são sensíveis à temperatura. No caso das enzimas, existem dois mecanismos relacionados aos efeitos intrínsecos de mudanças de temperatura. No primeiro mecanismo, uma variante enzimática é expressa no período de aclimação dos peixes e esta foi adaptada para funcionar na temperatura específica. Esse mecanismo não está

presente em todas as espécies de peixe, apresentando-se com mais frequência em organismos poliploides. No segundo mecanismo, mais comum em peixes, a quantidade da enzima é ajustada de acordo com a nova temperatura por meio de ajustes das taxas de renovação de proteínas (Moerland, 1995). Dessa forma, apesar do aumento da temperatura provocar um aumento na geração de ERO's, essa também aumenta a atividade das enzimas no tecido, seja por meio do aumento na eficiência catalítica ou pela alteração na quantidade de enzimas disponíveis (Baldwin et al., 1975).

Segundo Carvalho e Fernandes (2006), o aumento da temperatura também pode aumentar a frequência respiratória favorecendo o consumo de metais pelas brânquias. Por outro lado, o aumento da temperatura também facilita o processo de depuração, contrapondo a taxa de acumulação do metal e fazendo com que a bioacumulação em ambientes de águas de temperaturas mais altas seja menor. Com uma menor bioacumulação, os efeitos nocivos do metal são menores quando comparados aos efeitos em águas de temperaturas mais frias.

#### **1.4. Biomarcadores**

Para análise dos efeitos do chumbo e da temperatura, no metabolismo dos peixes, são utilizados biomarcadores, que são medidas em fluidos corporais, células ou tecidos dos bioindicadores, que indicam modificações celulares ou bioquímicas devido a presença de tóxicos no ambiente (NRC, 1987). Os biomarcadores indicam se os organismos foram expostos aos tóxicos e a magnitude da exposição, por meio da resposta do organismo ao contaminante. Além disso, contribuem para detecção, quantificação e entendimento da significância da exposição química no ecossistema. Essas determinações podem ajudar a mensurar o potencial de exposição humana, aos contaminantes e, conseqüentemente, os riscos oferecidos à sociedade (McCarthy e Shugart, 1990).

No caso do estresse oxidativo, os biomarcadores utilizados são enzimas cujo papel é interceptar e inativar os radicais das ERO's (Davies, 1995). Entre as enzimas utilizadas estão a Catalase (CAT) e a Glutathione-S-Transferase (GST). A função da CAT é decompor o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio. Qualquer redução nos níveis desses antioxidantes resulta em peroxidação lipídica, já que os antioxidantes produzidos não serão suficientes para desmutar o excesso de radicais livres produzidos (Vutukuru et al., 2006). A GST possui um papel importante na desintoxicação dos poluentes ambientais (Masella et al., 2005) pois catalisam a conjugação da Glutathione reduzida (GSH) com compostos tóxicos exógenos e endógenos, fazendo com que estes se tornem mais solúveis na água, menos tóxicos e mais fáceis de serem excretados (Lee et al., 2006).

Outro biomarcador importante nos estudos ecotoxicológicos, são as perturbações estruturais ao DNA, que podem causar lesões permanentes. As células afetadas geralmente demonstram funções alteradas, indicando uma modificação genotóxica (Van der Oost et al., 2003). Uma dessas alterações é o aparecimento do micronúcleo, observado por meio de um teste feito nos eritrócitos que, segundo Matsumoto et al., (2006), avalia o potencial clastogênico de uma substância. A formação do micronúcleo consiste no encapsulamento de fragmentos cromossômicos retardados, durante a formação das membranas nucleares, no final da mitose (Schubert e Oud, 1997).

### **1.5. *Geophagus brasiliensis* como bioindicador**

O *G. brasiliensis* pertence à família dos ciclídeos, família de peixe mais rica em espécies (não Ostariofisos) habitantes de água doce do mundo, e uma das maiores famílias de vertebrados que conta com cerca de 1300 espécies, porém, com estimativa de 1900 espécies. A distribuição geográfica inclui 219 espécies conhecidas, somente da

América do Sul (Kullander, 1998). Nos rios costeiros do Brasil, habitam cerca de 1-3 espécies de ciclídeos, e conhecidos, em sua maioria, como Acarás (Kullander, 2003).

O ciclídeo *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) possui ampla distribuição, presentes da costa leste e sul do Brasil e Uruguai (Sabino e Castro, 1990), sendo nativos do Brasil (Kullander, 2003). Essa espécie ocorre em diversos ecossistemas aquáticos como córregos (Sabino e Castro, 1990), lagoas (Vono e Barbosa, 2001), planícies de inundação (Meschiatti, 1995; Bastos et al., 2011), lagoas costeiras (Loebmann e Vieira, 2005) e também estuários (Garcia et al., 2003). Kubitza (2000) relatou que *G. brasiliensis* possui temperatura ótima para desenvolvimento entre 22 e 28°C. Porém, Amaral et al. (2011) relataram experimento sem mortalidade à 17,7°C e Andreatta et al. (1997) não observou mortalidade em até 30°C. Essa alta resistência à variações de temperatura pode estar relacionada à sua ampla distribuição geográfica e suas diferentes variações sazonais.

Por conta do comportamento variado, tamanho moderado, coloração atrativa e alta resistência à variação de temperatura, *G. brasiliensis* é comumente utilizado como peixe ornamental, assim como outras espécies de ciclídeos. Por conta disso, a espécie tem sido introduzida em países como Taiwan, Filipinas e Austrália (Liang et al., 2006; Fishbase 2012; Beatty et al., 2013), causando impactos negativos nos ecossistemas locais. Beatty et al. (2013) relataram que o fato de *G. brasiliensis* ser uma espécie onívora, permite que ocupem uma área mais ampla de ecossistemas. Isso resulta em impactos negativos na estrutura e função do ecossistema aquático, tornando difícil a predição do mesmo devido à dissociação das cascatas tróficas.

*Geophagus brasiliensis* possui dimorfismo sexual quando atingem o estado juvenil. Os ovos são depositados no substrato e ambos os reprodutores apresentam cuidado parental até mesmo depois da eclosão dos ovos. Houve relatos de incubação oral após o

desenvolvimento avançado dos ovos ou da eclosão dos mesmos (Kullander, 2003). Durante seu desenvolvimento, os juvenis de *G. brasiliensis* se alimentam de plânctons (Lazzaro, 1991). Depois de adultos, se tornam onívoros predando principalmente crustáceos, insetos e plantas (Abelha e Goulart, 2004), porém, existe relatos da presença de moluscos, peixes, aracnídeos, anelídeos e detritos em seu trato intestinal (Bastos et al., 2011). Segundo Hauser-davis et al. (2010), os peixes onívoros são bons bioindicadores pois têm a dieta variada, com ampla fonte de contaminação proveniente de diversos alimentos, que também são expostos ao contaminante e bioacumulam o metal.

**ARTIGO**

**BIOACUMULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* (QUOY & GAIMARD, 1824) EXPOSTOS A ALIMENTOS CONTAMINADOS COM CHUMBO EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

## 2. INTRODUÇÃO

A ocorrência de metais nos lixiviados de indústrias é de grande interesse por estarem presentes em grandes quantidades e serem constantemente descarregados em ambientes aquáticos (Chen et al., 2016). Dentre os metais, o chumbo é um elemento não essencial que ocorre naturalmente na natureza. Porém, devido a atividades humanas, sua concentração tem aumentado no ambiente natural (García-Lestón et al., 2010). A exposição do chumbo em ambientes aquáticos pode afetar a reprodução, o crescimento e o comportamento dos peixes (Burden et al., 1998) já que o metal bioacumula facilmente e é tóxico mesmo em concentrações mais baixas (Shah, 2006).

A presença de metais nos ecossistemas aquáticos, gera preocupações em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico dessas substâncias (Ribeiro et al., 2000). As investigações dos efeitos tóxicos do chumbo, em peixes, demonstraram ocorrência de aberrações citogenéticas (Cestari et al., 2004) e alterações dos parâmetros hematológicos, restringindo a ação das enzimas na biossíntese da hematina (Vinodhini e Narayanan, 2009).

Além disso, ao contrário dos contaminantes orgânicos, o chumbo não sofre degradação, mas persiste na natureza e possui um lento processo de eliminação (Merciai et al., 2015), podendo ser bioacumulado e biomagnificado. Dessa forma, os organismos aquáticos podem acumular o chumbo por meio das vias respiratórias e por meio da ingestão, pela cadeia trófica (Van der Oost et al., 2003; Couture e Pyle, 2012; Zeng et al., 2012). Assim, em regiões onde os organismos aquáticos são consumidos pelos humanos, a bioacumulação pode ser considerado um risco à saúde pública (Campbell, 1994).

Em adição aos efeitos do metal, os organismos aquáticos estão expostos à constantes mudanças naturais, em seu ecossistema. A elevação da temperatura em ambientes aquáticos tende a aumentar a taxa de difusão, acelerando reações químicas e podendo causar desequilíbrio em vários processos. Em organismos ectotérmicos, a temperatura é influenciada no metabolismo e nas capacidades locomotoras (Guderley, 2004). Assim, o organismo precisa, ou compensar as taxas metabólicas modificadas pela temperatura, pelo processo de aclimação, ou minimizar as mudanças em sua temperatura corporal, pela termorregulação (Reynolds e Casterlin, 1980).

Os ecossistemas de água doce são particularmente vulneráveis à mudança de temperatura porque são relativamente isolados e fragmentados. A variação da temperatura da água ocorre em 1) padrão sazonal, com temperaturas médias mais baixas no inverno e mais altas no verão, 2) em um gradiente latitudinal, com temperaturas mais altas em latitudes mais baixas e temperaturas mais baixas em altas latitudes e 3) em um gradiente de altitude com temperaturas mais altas em baixas altitudes e temperatura mais baixa em altas altitudes. Com isso, populações de espécies que ocupam diferentes habitats e possuem ampla distribuição geográfica, como o *G. brasiliensis*, que está presente da costa leste e sul do Brasil e Uruguai, estão expostas a temperaturas médias diferentes ao longo do seu ciclo de vida. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar alterações enzimáticas, genotóxicas e o teor de metais nos tecidos de peixes contaminados com diferentes concentrações de chumbo e sob variação de temperatura ambiental.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Aclimação e desenho experimental**

O experimento foi realizado após aprovação do comitê de ética animal (CEUA/UVV). Trinta e dois juvenis de *Geophagus brasiliensis* ( $5,84 \text{ g} \pm 1,88$ ;  $7,33 \text{ cm} \pm 0,88$ ) foram obtidos em uma piscicultura do IFES de Alegre/ES e transferidos para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (LabPeixe/UVV). No laboratório, os peixes foram igualmente divididos em dois tanques de 150L, contendo oxigenação constante. Um dos tanques foi mantido a  $25^{\circ}\text{C}$  ( $25,03^{\circ}\text{C} \pm 0,21$ ) com auxílio de um condicionador de ar acondicionado a  $25^{\circ}\text{C}$ . No outro tanque, os peixes foram ambientados a  $25^{\circ}\text{C}$  e a água foi aquecida em  $1^{\circ}\text{C}$  por dia, até atingir  $28^{\circ}\text{C}$  ( $28,17^{\circ}\text{C} \pm 0,28$ ), com a utilização de um aquecedor de 200W acoplado a um termostato (Precisão de  $0,1^{\circ}\text{C}$ ). A aclimação nas temperaturas desejadas ( $25$  e  $28^{\circ}\text{C}$ ) foi de 30 dias. Durante esse período, os peixes foram alimentados diariamente com ração extrusada (pellet de 3 mm) contendo 45% de proteína, à vontade. Cerca de 40% da água foi trocada a cada 7 dias por água de mesma temperatura do tanque de aclimação.

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos individualmente para 32 aquários de 30 litros (16 aquários a  $25^{\circ}\text{C}$  e 16 aquários a  $28^{\circ}\text{C}$ ), devidamente descontaminados. Os indivíduos foram separados individualmente de forma que não houvesse diferença no consumo da ração, entre as réplicas. Os aquários foram abastecidos com água proveniente do sistema de abastecimento urbano, decloradas naturalmente e previamente mantidas nas devidas temperaturas. A água dos aquários de  $25^{\circ}\text{C}$  foi obtida com a climatização da sala com um condicionador de ar e, para os aquários mantidos a  $28^{\circ}\text{C}$ , foram utilizados aquecedores de 50W acoplados a um termostato (Precisão de  $0,1^{\circ}\text{C}$ ). Todos os aquários possuíam aeração constante. Antes de iniciar o experimento, os peixes foram aclimatados nesse aquário por 7 dias, tempo

necessário para que consumissem toda a ração ofertada (1,5% do peso vivo/dia). A determinação da quantidade de ração foi modificada ao longo do período de aclimatação a fim de obter um consumo satisfatório, em 15 minutos. Durante esse período, a temperatura foi medida diariamente, e mantida nos níveis desejados.

O experimento teve duração de 15 dias. Os peixes foram expostos ao chumbo (Pb), em concentrações nominais de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração (Substância de exposição: Nitrato de Chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ); Sigma<sup>®</sup>) (Kim e Kang, 2015) nas duas condições de temperatura (25 e 28°C), totalizando 4 tratamentos (25/0, 25/60, 28/0 e 28/60). Cada tratamento com 8 repetições. A concentração de chumbo foi determinada por meio do estudo da literatura para que houvesse bioacumulação significativa, permitindo a observação do seu efeito em relação à variação de temperatura. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial extrusada (45% de proteína bruta – marca Propescado), contendo as concentrações específicas de chumbo, na taxa de 1,5% do peso vivo, dividido em duas refeições (9:00h e 16:00h).

A contaminação da ração foi feita com a adição da quantidade de chumbo para a concentração desejada. Foram pesados 19,2 mg de Nitrato de Chumbo para 200 g de ração, a fim de obter a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração. O Nitrato de Chumbo foi diluído em 23,3 ml de água deionizada com 0,8 g de gelatina bovina, a fim de obter maior adesão aos pellets de ração. A ração dos tratamentos a 0 mg de chumbo/kg de ração foi tratada da mesma forma, exceto pela adição do Nitrato de Chumbo. As soluções foram borrifadas nas rações dos respectivos tratamentos alguns dias antes da exposição dos exemplares. A ração foi seca em estufa a 55°C.

Para maior precisão no experimento, uma amostra da ração foi digerida em chapa quente utilizando 4 ml de ácido nítrico na proporção de 1:1, mais 10 ml de ácido nítrico na proporção de 1:4. Foram aquecidas a 95°C por 30 minutos e avolumadas para 100

ml. Depois, a concentração de chumbo foi medida em forno grafite, em um espectrofotômetro de Absorção atômica (Thermo ICE3500).

Os aquários foram mantidos em uma sala, com fotoperíodo controlado (12h:12h). A água dos aquários foi parcialmente trocada (70%) uma vez por semana e a água de fundo foi sifonada todos os dias. A água adicionada estava sempre na mesma temperatura da água dos aquários testes. Foram realizadas análises diárias de temperatura ( $25,03^{\circ}\text{C} \pm 0,43$ ;  $28,11^{\circ}\text{C} \pm 0,46$ ), oxigênio dissolvido ( $7,84 \pm 0,44$ ;  $7,51 \pm 0,58$ ), pH ( $6,56 \pm 0,23$ ;  $6,62 \pm 0,26$ ) e condutividade ( $104,28 \pm 8,63$ ;  $119,36 \pm 9,33$ ), com auxílio de um multiparâmetro YSI Environmental. Análises de nitrito ( $0,20 \pm 0,14$ ;  $0,10 \pm 0,06$ ) e amônia ( $0,44 \pm 0,28$ ;  $0,37 \pm 0,18$ ) foram realizadas semanalmente, por colorimetria e a dureza ( $48,94 \pm 10,70$ ;  $51,04 \pm 5,92$ ), semanalmente, por titulação. Os resultados são de 25 e a  $28^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

Ao final do período experimental, os peixes foram anestesiados com solução de Benzocaína ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e o sangue foi coletado por punção da veia caudal, o qual foi utilizado para análise genotóxica pelo teste de micronúcleo. Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por secção cervical e em seguida foram retiradas as brânquias, o fígado, o intestino e o músculo e imediatamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises de metal no tecido e das atividades enzimáticas (Catalase e GST).

### **3.2. Concentração de chumbo nos tecidos**

Para determinação da concentração de chumbo nos tecidos coletados, foi utilizado um digestor por energia em micro-ondas (Speedwave Four, Berghof<sup>®</sup>). A digestão foi feita sob pressão a 35 bpm, com temperatura mínima de  $180^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $220^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos, utilizando 4 ml de ácido nítrico ultrapuro ( $\text{HNO}_3$ ) e 1 ml de peróxido de

hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os frascos foram descontaminados entre cada processo com 5 ml de ácido nítrico, seguindo o protocolo de descontaminação do aparelho.

Depois de digeridas, as amostras foram utilizadas para quantificação de chumbo em forno grafite, no espectrofotômetro de Absorção atômica (Thermo ICE3500).

### **3.3. Estresse oxidativo**

Para determinação do estresse oxidativo, foi feita a determinação de proteína e das enzimas Catalase (CAT), na concentração de 1:4, e Glutathione-S-transferase (GST), na concentração de 1:10, nas brânquias e no músculo. As amostras foram homogeneizadas com Tampão Homogeneização (pH 7,6) e centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, a 13000 rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de proteínas.

#### **3.3.1. Proteínas totais**

Para determinação das proteínas totais, foi preparada uma curva padrão com concentração final de 800 µg. Essa solução foi diluída em série para obtenção das concentrações finais de 400 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg e 6,25 µg.

Para análise da proteína, pipetou-se 5 µl das soluções da curva padrão, na microplaca, além do branco (água miliQ). Depois, pipetou-se 5 µl da amostra e mais 200 µl da solução de Bradford em todos os poços ocupados.

A leitura foi feita no aparelho de espectrofotômetro Spectramax 190, a 595nm (Bradford, 1976).

#### **3.3.2. Catalase**

Para análise, foi utilizado o Tampão de leitura enzimática (Tampão TE), de pH 8,0. A análise foi realizada no espectrofotômetro Bioespectro SP-220, em um comprimento de

onda de 240 nm, durante 1 minuto. A fórmula utilizada para o cálculo foi Variância da absorção / Valor da proteína em  $\mu\text{g} * 0,071$  (fator de correção da catalase).

### **3.3.3. Glutathione-S-Transferase**

Para análise, foi utilizado o Tampão de reação (Tampão Fosfato), de pH 7,0, juntamente com CDNB e GSH. A leitura foi feita no espectrofotômetro leitor de placa a 25°C, 340 nm, por 1 minuto. A fórmula utilizada para o cálculo foi Valor da absorbância \* 10 (proporção de diluição) \* 260 (volume total da amostra, para análise) / Valor da proteína em  $\mu\text{g} * 10$  (volume utilizado da amostra) \* 9,6 (fator de correção da GST).

### **3.4. Efeitos genotóxicos**

Os efeitos genotóxicos, foram determinadas pela análise da presença dos micronúcleos nas células sanguíneas. Após a obtenção do sangue pela veia caudal, este foi depositado em lâminas, em duplicata. Foi feito um esfregaço, em duplicata, a fim de maior distribuição celular após secagem por 3 horas. Depois, as lâminas foram fixadas com Metanol e deixadas para secagem por 24 horas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 40 minutos e, na sequência, lavadas com água destiladas e dispostas para nova secagem. A contagem de células foi feita no microscópio Nikon Eclipse E200LED, com objetiva de 100x, com auxílio do óleo de imersão. Para determinação da quantidade de micronúcleos, as frequências foram calculadas e expressas por 1000 células.

### **3.5. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos são apresentados como média e desvio padrão. Os dados obtidos foram testados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados da concentração de chumbo nos tecidos e de estresse oxidativo foram analisados por uma ANOVA de dois fatores (temperatura e concentração de chumbo), seguido do teste

de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados de micronúcleo foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Sigmaplot 12.5, Systat Software, Inc.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise de chumbo na ração e na água

Quando analisada a quantidade de chumbo presente na ração, o controle apresentou uma média de  $0,13 \pm 0,0009$  mg de Pb/kg de ração. A ração contaminada apresentou uma concentração média de  $53,61 \pm 10,12$  mg de Pb/kg de ração (recuperação = 90%).

A concentração média de chumbo na água foi maior no tratamento 25/60 ( $0,16 \pm 0,27$  mg de Pb/L de água), como demonstrado na Tabela 1.

Temperatura (°C)	Concentração de chumbo (mg de Pb/kg de ração)	Concentração de chumbo (mg de Pb/L de água)
25	0	$0,04 \pm 0,01$ a
	60	$0,16 \pm 0,27^*$ A
28	0	$0,022 \pm 0,01$ a
	60	$0,096 \pm 0,030$ B

**Tabela 1.** Concentração de chumbo na água dos aquários expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

### 4.2. Concentração de chumbo no tecido

O fígado apresentou concentração de chumbo de 10,42 mg de chumbo/kg de peixe acumulados no tratamento 25/60. Houve um aumento de 8,3 mg de chumbo/kg de peixe entre os tratamentos 25/0 e 25/60. O tratamento 28/60 apresentou uma concentração de

chumbo de  $7,24 \pm 3,75$  mg de chumbo/kg de peixe, resultando um aumento de 4,61 mg de chumbo/kg de peixe acumulados, quando comparado ao tratamento 28/0 ( $p = 0,041$ ).

A concentração de chumbo no fígado não apresentou dependência em relação às diferentes temperaturas, independente da concentração à que os organismos foram expostos ( $p = 0,684$  quando expostos à 0 mg de chumbo/kg de ração e  $p = 0,950$  quando expostos à 60 mg de chumbo/kg de ração) (Figura 1a).

Nas brânquias, houve um aumento de cerca de 11,70 mg de chumbo/kg de peixe, no tratamento 25/60, em relação ao tratamento 25/0. Os organismos expostos à concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, obtiveram uma concentração de chumbo de  $3,60 \pm 1,96$  mg de chumbo/kg de peixe, resultando em um aumento de mais de 3 mg de chumbo/kg de peixe acumulados entre as duas concentrações ( $p = 0,018$ ).

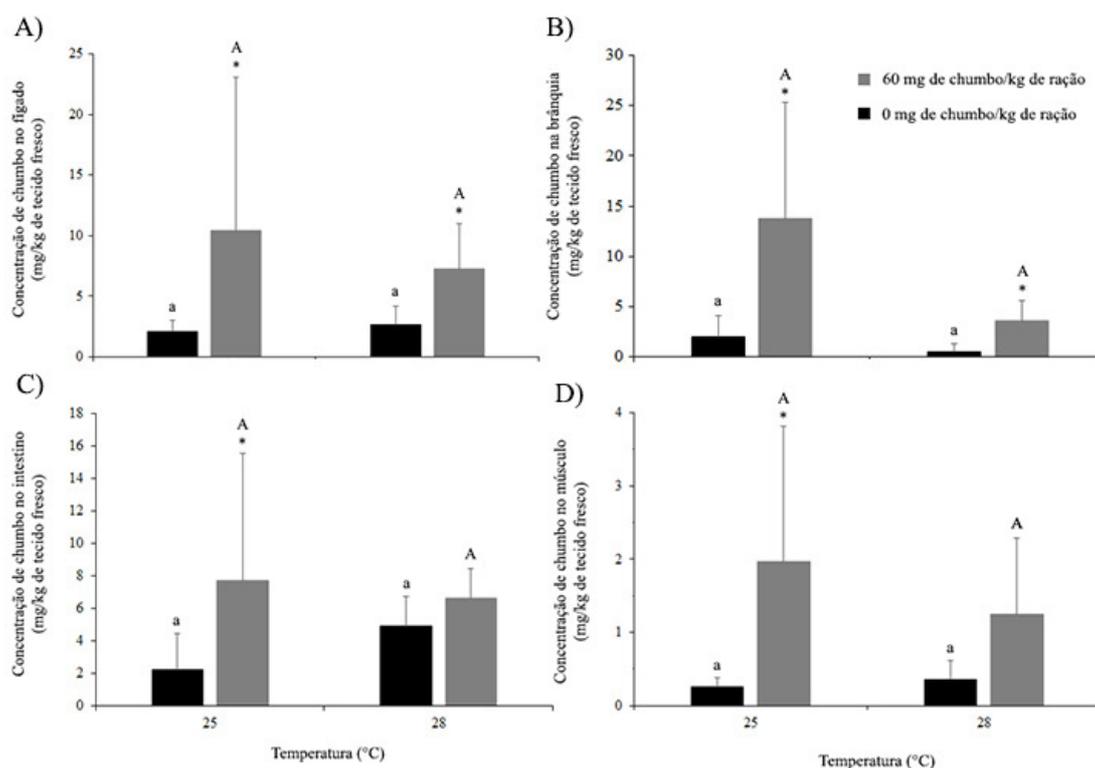
A concentração de chumbo nas brânquias não apresentou dependência em relação às diferentes temperaturas, independente da concentração à que os organismos foram expostos ( $p = 0,230$  quando expostos à 0 mg de chumbo/kg de ração e  $p = 0,239$  quando expostos à 60 mg de chumbo/kg de ração) (Figura 1b).

O intestino apresentou um aumento de cerca de 5,48 mg de chumbo/kg de peixe, entre os tratamentos 25/0 e 25/60.

A concentração de chumbo no intestino também não apresentou dependência em relação às diferentes temperaturas, independente da concentração à que os organismos foram expostos ( $p = 0,054$  quando expostos à 0 mg de chumbo / kg de ração e  $p = 0,867$  quando expostos à 60 mg de chumbo / kg de ração) (Figura 1c).

O músculo foi o tecido que apresentou menor concentração de chumbo, entre os tecidos analisados. Foi observado um aumento de cerca de 1,71 mg de chumbo/kg de peixe, entre os tratamentos 25/0 e 25/60.

A concentração de chumbo no músculo não apresentou dependência em relação às diferentes temperaturas, independente da concentração à que os organismos foram expostos ( $p = 0,611$  quando expostos à 0 mg de chumbo/kg de ração e  $p = 0,624$  quando expostos à 60 mg de chumbo/kg de ração) (Figura 1d).



**Figura 1.** Concentração de chumbo no fígado (A), na brânquia (B), no intestino (C) e no músculo (D) de indivíduos adultos de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo /kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

### **4.3. Estresse oxidativo**

#### **4.3.1. Atividade enzimática nas brânquias**

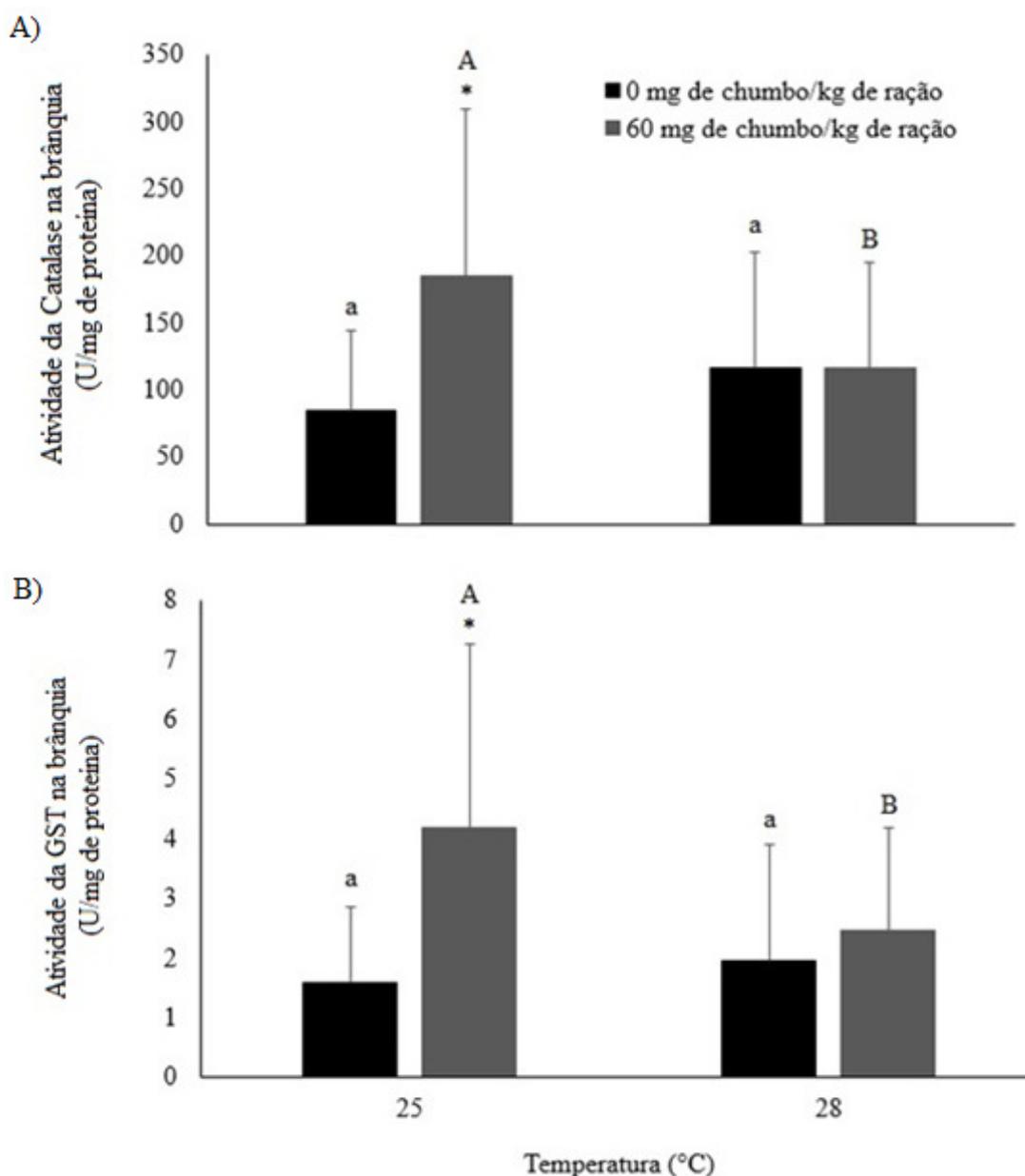
A brânquia foi o tecido que apresentou maior aumento na atividade da enzima CAT. A atividade da CAT aumentou cerca de 101,02 U/mg de proteína quando comparados os tratamentos 25/0 e 25/60.

A atividade da CAT nas brânquias dos peixes alimentados com 60 mg de chumbo/kg de ração, demonstrou dependência quanto à quantidade de chumbo e sua interação com a variação de temperatura. Os organismos expostos a essa concentração, a 25°C, apresentaram uma atividade de  $185,35 \pm 124,30$  U/mg de proteína, enquanto os organismos expostos a essa concentração, a 28°C, apresentaram atividade significativamente menor, de  $116,67 \pm 77,94$  U/mg de proteína ( $p = 0,003$ ). Os organismos expostos à concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração não apresentaram mudança significativa na taxa de atividade da CAT, em relação às temperaturas de 25 e 28°C ( $p = 0,132$ ) (Figura 2A).

Ainda nas brânquias, a GST apresentou atividade semelhante à da CAT. Houve um aumento cerca de 2,62 U/mg de proteína entre os tratamentos 25/0 e 25/60 ( $p < 0,001$ ). A 28°C, a atividade da GST não apresentou aumento significativo em relação às diferentes concentrações de chumbo ( $p = 0,996$ ).

A atividade da GST nas brânquias expostas a 60 mg de chumbo/kg de ração, demonstrou dependência quanto à quantidade de chumbo e sua interação com a variação de temperatura ( $p = 0,014$ ). Os organismos expostos ao tratamento 25/60 apresentaram uma atividade de  $4,20 \pm 3,06$  U/mg de proteína, enquanto os organismos expostos a 28/60, apresentaram atividade significativamente menor, de  $2,46 \pm 1,74$  U/mg de proteína. Os organismos expostos à concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração não

apresentaram mudança significativa na taxa de atividade da GST, em relação às temperaturas de 25 e 28°C ( $p = 0,554$ ) (Figura 2B).



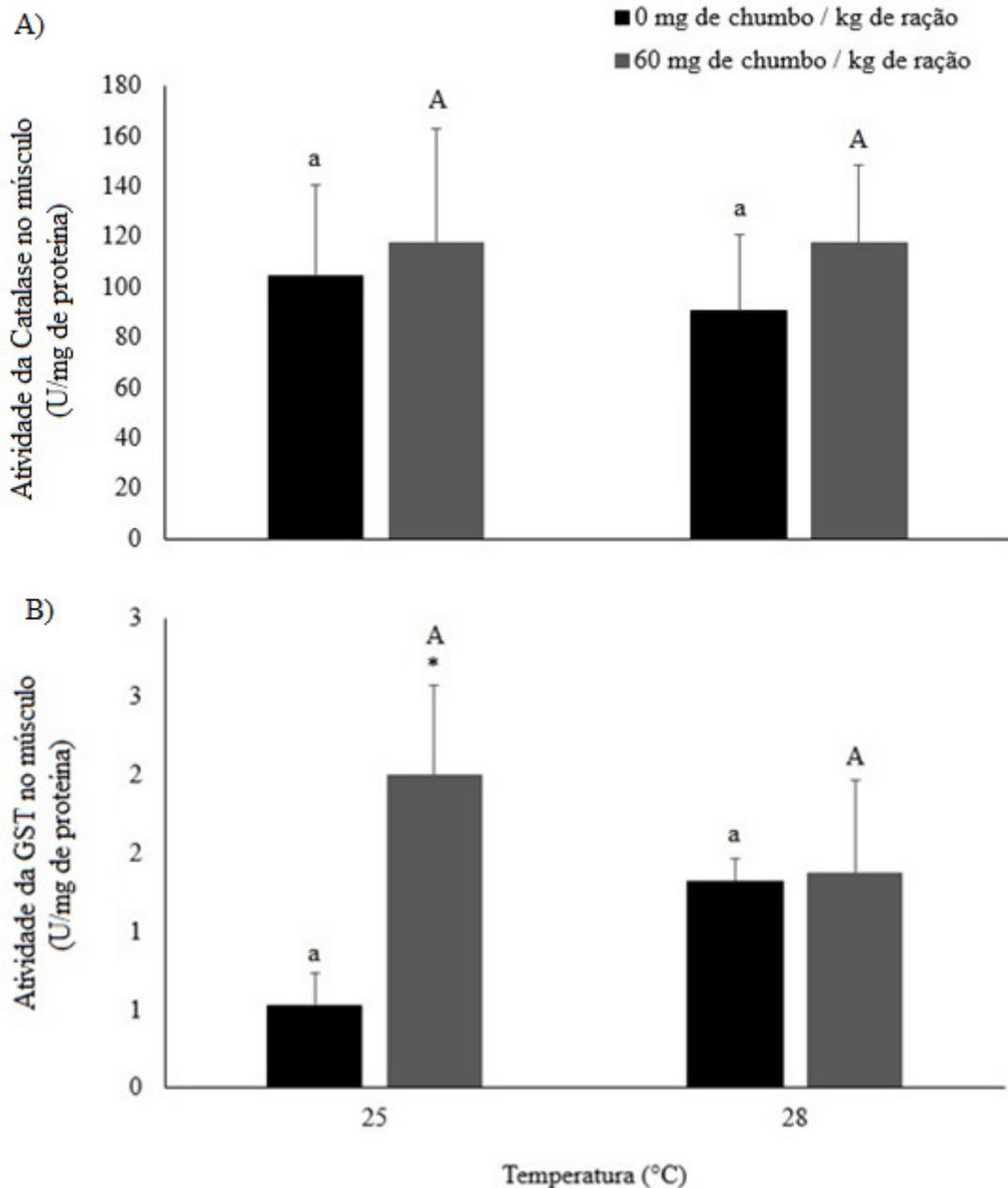
**Figura 2.** A) Atividade da enzima Catalase (CAT) nas brânquias de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C; B) Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) nas brânquias de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a

concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

#### **4.3.2. Atividade enzimática no músculo**

As mesmas enzimas, no músculo, não demonstraram o mesmo padrão de atividade. Na CAT, as diferenças dos valores das médias, entre os níveis de temperatura, não foram significativas em relação às concentrações de chumbo ( $p = 0,875$ ). Da mesma forma, os valores dos níveis de chumbo não foram significativos, quando comparados à temperatura ( $p = 0,396$ ). O efeito da temperatura não depende dos níveis de chumbo presentes na dieta, não tendo uma interação significativa entre os dois ( $p = 0,158$ ) (Figura 3A).

A GST, no músculo, apresentou um aumento significativo, de 1,47 U/mg de proteína, somente no tratamento 25/60 ( $p = 0,003$ ). A atividade da GST, no músculo, não apresentou dependência em relação às diferentes temperaturas, independente da concentração à que os organismos foram expostos ( $p = 0,057$  quando expostos à 0 mg de chumbo/kg de ração e  $p = 0,112$  quando expostos à 60 mg de chumbo/kg de ração) (Figura 3B).



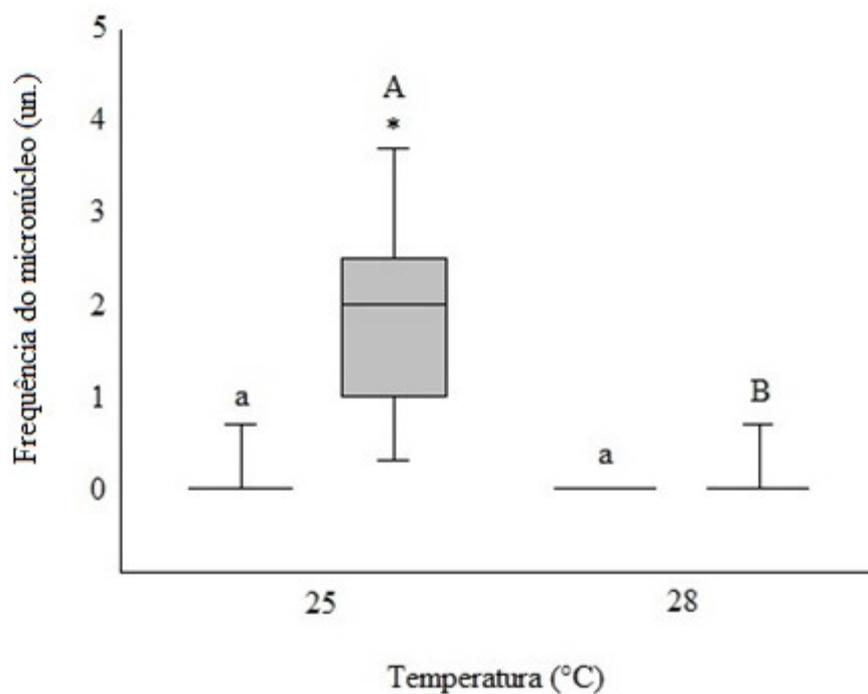
**Figura 3.** A) Atividade da enzima Catalase (CAT) no músculo de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C; B) Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) no músculo de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco

(\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

#### **4.4. Efeitos genotóxicos**

Em relação à frequência do micronúcleo, houve um aumento significativo no tratamento 25/60. No tratamento 25/0, a frequência do micronúcleo foi de  $1 \pm 0,35$ . No tratamento 25/60, a frequência do micronúcleo foi de  $15 \pm 1,25$  ( $p = 0,003$ ). No tratamento 28/0, a frequência foi de 0 micronúcleo e no tratamento 28/60, a frequência foi de  $1 \pm 0,35$  micronúcleo ( $p = 0,721$ ).

A frequência do micronúcleo no sangue dos organismos expostos a 60 mg de chumbo/kg de ração, demonstrou dependência quanto à quantidade de chumbo e sua interação com a variação de temperatura ( $p = 0,003$ ). Os organismos expostos ao tratamento 25/60, apresentaram uma frequência de  $15 \pm 1,25$  micronúcleos, enquanto os organismos expostos ao tratamento 28/60, apresentaram frequência significativamente menor, com 0 micronúcleo registrado (Figura 4).



**Figura 4.** Frequência de danos genotóxicos no sangue de juvenis de *G. brasiliensis* expostos às concentrações de 0 e 60 mg de chumbo/kg de ração e às temperaturas de 25 e 28°C. As letras minúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 0 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas; as letras maiúsculas representam diferença significativa entre a concentração de 60 mg de chumbo/kg de ração, em diferentes temperaturas. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre as diferentes concentrações, na mesma temperatura.

## 5. DISCUSSÃO

A taxa de acumulação do chumbo pode ser influenciada pelas condições ambientais as quais os peixes estão expostos. A temperatura, por exemplo, influencia na cinética da absorção, biotransformação e eliminação do chumbo. Quando a taxa de absorção é maior do que a taxa de eliminação, o chumbo é bioacumulado pelo peixe (Douben, 1989; Baykan et al., 2007). Temperaturas elevadas também influenciam no metabolismo dos peixes, aumentando a frequência respiratória e a energia necessária para a realização das atividades metabólicas (Niimi e Beamish, 1974; Douben, 1989). Douben (1989) relatou maior consumo e eliminação da ração em *Noemacheilus barbatulus*, contaminados com Cádmio, em uma faixa de temperatura de 8-18°C. No presente estudo, os peixes expostos ao tratamento 28/60 apresentaram menor acumulação do metal, sendo a taxa de eliminação maior do que a taxa de absorção.

O fígado e o intestino são órgãos de maior preocupação em estudos ecotoxicológicos por acumularem quantidades significativas de metais, via dieta (Van der Oost et al., 2003). Os resultados mostraram que o fígado pode ser um centro de desintoxicação, em peixes, e pode ser um ótimo indicador de poluição ambiental, já que apresentou bioacumulação significativa, nos tratamentos expostos à dieta contendo chumbo. Licata et al. (2005) apresentaram resultados semelhantes quando compararam a presença de metais no fígado e no músculo, em indivíduos de *Thunnus thynnus*, coletados no estreito de Messina, na Itália. Em estudos feitos com cádmio em *Oncorhynchus mykiss* e *Cyprinus carpio*, Hollis et al. (2001) e Smet et al. (2001) apontaram a importância do fígado na proteção de órgãos mais vulneráveis contra a toxicidade dos metais não-essenciais, reportando um maior acúmulo de metal nesse tecido.

Os resultados da concentração do chumbo nas brânquias, também apresentaram acúmulo significativo nos indivíduos expostos à dieta contendo chumbo. O acúmulo de

metal pela brânquia em estudos via dieta também foi relatado por Szebedinszky et al. (2001) e Kim e Kang (2015). A brânquia é um dos órgãos mais vitais nas funções de trocas gasosas, transporte iônico, regulação ácido-base e excreção de resíduos nitrogenados, assim como detoxificação (Goss et al., 1998). Szebedinszky et al. (2001) assumiram que os metais acumulados internamente difundiram através das brânquias para a camada de divisão entre a água e a mucosa, circundando as brânquias e simulando, assim, a exposição ao metal pela água. Kim e Kang (2015) explicaram que a bioacumulação de metal pelas brânquias, em animais contaminados via dieta, induz a um desvio do metal, da corrente sanguínea para as membranas celulares basolaterais, também simulando a exposição via aquática. O acúmulo de chumbo pelas brânquias pode ter sido a causa do alto nível da taxa de atividade das enzimas CAT e GST, nas brânquias. A presença do contaminante estimulou a produção de ERO's, aumentando a atividade enzimática proporcionalmente (Davies, 1995). Como a bioacumulação no tratamento 25/60 foi maior, a atividade enzimática desse tratamento também foi maior, a fim de interceptar e inativar os radicais das ERO's.

É evidente que cada órgão possui uma função diferente na metabolização do metal. Por isso, os poluentes raramente estão distribuídos igualmente por todos os tecidos (Allen, 1995; Cinier et al., 1999). Os resultados corroboram tal afirmação e mostram que a exposição ao chumbo, via dieta, apresenta diferentes níveis de bioacumulação nos tecidos (Brânquia > Fígado > Intestino > Músculo).

A bioacumulação do músculo foi a menor dentre os tecidos analisados. Miller et al. (1992) e Dural et al. (2007) afirmam que o músculo é considerado um pobre indicador de poluição por metais por ser o tecido com menor taxa de bioacumulação de metais. Apesar disso, Zeng et al. (2012) relataram uma pequena taxa de bioacumulação em peixes coletados do lago Taihu, na China. Isso é explicado pelo fato de que a

bioacumulação de metais nos músculos dos peixes pode ser fortemente influenciada pelo seu tamanho, peixes menores possuem uma maior taxa de bioacumulação, comparadas às taxas de bioacumulação de peixes com tamanhos maiores (Widianarko et al., 2000; Farkas et al., 2003; Zhang and Wang, 2007; Qiu et al., 2011). Os resultados obtidos na bioacumulação do músculo são semelhantes aos relatados por Qiu et al. (2011), devido ao tamanho reduzido dos indivíduos utilizados no experimento. Outro fator determinante na bioacumulação do chumbo é o tempo de exposição. Kim e Kang (2015) testaram a bioacumulação do chumbo em *Sebastes schlegelii* com tempo de exposição de 2 e 4 semanas e observaram um aumento significativo de 30 mg/kg de chumbo, no fígado, em 4 semanas de exposição. No intestino e na brânquia houve um aumento significativo de 60 mg/kg entre os tempos de exposição, apesar do acúmulo ter sido menor, em relação ao fígado. A bioacumulação observada no músculo dos indivíduos expostos ao tratamento 25/60 explica o aumento na taxa da atividade da enzima GST, no mesmo tratamento, já que esta é responsável por tornar os poluentes ambientais mais solúveis na água, menos tóxicos e mais fáceis de serem excretados (Lee et al., 2006).

A bioacumulação do chumbo pelos peixes também pode causar anomalias genéticas, como a formação do micronúcleo, que se dá quando um cromossomo, ou um fragmento do mesmo, falha em migrar com uma das duas células filhas formadas durante a mitose. A bioacumulação de metal pelo peixe pode fazer com a frequência dessa falha aumente, detectando, assim, propriedades genotóxicas no contaminante (Udroiu, 2006). Os resultados acompanham os índices dos resultados de bioacumulação. Todos os indivíduos expostos a 60 mg de chumbo/kg de ração possuíram uma taxa de bioacumulação maior a 25°C. Com maior bioacumulação ocorre o aumento da frequência da falha, aumentando o número de micronúcleos detectados no tratamento.

Os peixes expostos à temperatura de 28°C possuem maior facilidade em excretar a ração contaminada, impedindo que o chumbo cause maiores danos ao indivíduo (Douben, 1989).

Em conclusão, os peixes expostos ao chumbo em temperaturas baixas bioacumulam de forma mais intensa, resultando em consequências fisiológicas e metabólicas claramente evidenciadas pelas respostas enzimáticas e genotóxicas obtidas. Em geral, o aumento da temperatura torna os processos metabólicos mais rápidos, tornando a excreção mais acentuada, mas também pode romper a integridade estrutural do organismo (Reynolds e Casterlin, 1980), podendo dificultar o processo de absorção e metabolização do metal, diminuindo a concentração de chumbo nos tecidos, como observado nos resultados obtidos a 28°C. O fato de *G. brasiliensis* possuir uma grande distribuição geográfica expõe as populações da espécie a diferentes variações de temperatura. Assim, diferentes populações estão sujeitas a diferentes impactos na ingestão do chumbo. Sendo assim, temperaturas mais altas pode ser um fator benéfico aos peixes contaminados por chumbo pois pode dificultar a absorção e metabolização do metal e facilitar a excreção, diminuindo os danos causados no organismo.

## 6. REFERÊNCIAS

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121-126.
- Abelha, M., Goulart, E., 2004. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 26, 37–45.
- Allen, P., 1995. Chronic Accumulation of Cadmium in the Edible Tissues of *Oreochromis aureus* (Steindachner): Modification by Mercury and Lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 8–14.
- Amaral, H., Netto, J.R., Garcia, S., Mello, G., 2011. Pesquisa de comparação entre a taxa de crescimento do Acará *Geophagus brasiliensis* e a Tilápia *Oreochromis niloticus* em condições de monocultivo intensivo utilizando ração e alimento vivo. *Rev. Eletrônica Veterinária* 1–22.
- Andreatta, J., Marca, A., Soarea, C., Santos, R., 1997. Distribuição mensal dos peixes mais representativos da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 14, 121–134.
- Bailey, S., Olin, T., Bricka, M., Adrian, D., 1999. A Review of Potentially Low-Cost Sorbents for Heavy Metals. *Water Res.* 33, 2469–2479.
- Baldwin, J.; Storey, K. B.; Hichachka, P. W., 1975. Lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate. *Biochem.J.* 84, 83.
- Bastos, R.F., Condini, M. V, Junior, A.S.V., Garcia, A.M., 2011. Diet and food consumption of the pearl cichlid *Geophagus brasiliensis* (Teleostei : Cichlidae): relationships with gender and sexual maturity. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 825–830.
- Baykan, U., Atli, G., e Canli, M., 2007. The effects of temperature and metal exposures

- on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 23 (1), 33-38.
- Beatty, S.J., Morgan, D.L., Keleher, J., Allen, M.G., Sarre, G.A., 2013. The tropical South American cichlid, *Geophagus brasiliensis* in Mediterranean climatic southwestern Australia. Aquat. Invasions 8, 21–36.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Burden, V.M., Sandheinrich, M.B., Caldwell, C., 1998. Effects of lead on the growth and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Environ. Pollut. 101, 285–289.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int. Microbiol. 3, 3–8.
- Campbell, K.R., 1994. Concentrations of Heavy Metals Associated with Urban Runoff in Fish Living in Stormwater Treatment Ponds. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 356, 352–356.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. Aquaculture 251, 109–117.
- Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Ribeiro, C., Costa, J., Pelletier, E., Ferraro, M.V.M., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. Genet. Mol. Biol.

274, 270–274.

Chapman, P.M., Wang, F., 2000. Issues in Ecological Risk Assessment of Inorganic Metals and Metalloids. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 6, 965–988.

Chen, M., Qin, X., Zeng, G., Li, J., 2016. Chemosphere Impacts of human activity modes and climate on heavy metal “spread” in groundwater are biased. *Chemosphere* 152, 439–445.

Cinier, C.D.C., Petit-ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 122, 345–352.

Couture, P., Pyle, G., 2012. Field studies on metal accumulation and effects in fish, *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Elsevier Inc 31 (11), 417-473.

Davies, K.J.A., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31.

Douben, P.E.T., 1989. Metabolic rate and uptake and loss of cadmium from food by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach). *Environ. Pollut.* 59, 177–202.

Dural, M., Goksu, M., Ozak, A., 2007. Investigatin of heavy metal levels in economically important fish species captures from the Tuzla lagoon. *Food Chem.* 102, 415-421.

Farkas, A., Salánki, J., Specziár, A., 2003. Age- and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low-contaminated site. *Water Res.* 37, 959–964.

Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat

Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River 4, 158–165.

Fishbase, 2012. Presents Scientific Information and Literature about Fish Species and Fish Distribution. Available at: <<http://www.fishbase.org>>. Access on: 16 Dez 2016.

Garcia, A., Raseira, M., Vieira, J., Winemiller, K., Grimm, A., 2003. Spatiotemporal variation in shallow-water freshwater fish distribution and abundance in a large subtropical coastal lagoon. *Environ. Biol. Fish* 68, 215–228.

García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., Laffon, B., 2010. Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environ. Int.* 36, 623–36.

Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119, 107–115.

Guderley, H., 2004. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 371–82.

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

Hauser-davis, R.A., Oliveira, T.F., Silveira, A.M., Silva, T.B., Ziolli, R.L., 2010. Case study: Comparing the use of nonlinear discriminating analysis and Artificial Neural Networks in the classification of three fish species: acarás (*Geophagus brasiliensis*), tilapias (*Tilapia rendalli*) and mullets (*Mugil liza*). *Ecol. Inform.* 5, 474–478.

Hernberg, S., 2000. Lead Poisoning in a Historical Perspective 254, 244–254.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1968. The adaptation of enzymes to temperature.

- Comp. Biochem. Physiol. 27, 659–668.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C., 2001. Tissue-Specific Cadmium Accumulation , Metallothionein Induction , and Tissue Zinc and Copper Levels During Chronic Sublethal Cadmium Exposure in Juvenile Rainbow Trout. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 468-474.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol. 57, 395–418.
- Karbassi, A.R., Bayati, I., Moattar, F., 2006. Origin and chemical partitioning of heavy metals in riverbed sediments. J. Environ. Sci. Technol. 3, 35–42.
- Kim, J.H., Kang, J.C., 2015. The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 115, 33–39.
- Kubitza, F., 2000. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Ed. do Autor.
- Kullander, S.O., 1998. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). Phyl. Class. Neo. Fish., 461-498.
- Kullander, S.O., 2003. Cichlidae (Cichlids). p. 605-654. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Kumada, H., Kimura, S., Yokote, M., 1980. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. 46, 97–103.
- Lapointe, D., Couture, P., 2010. Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 572–578.

- Lazzaro, X., 1991. Feeding convergence in South American and African zooplanktivorous cichlids *Geophagus brasiliensis* and *Tilapia rendalli*. *Environ. Int.* 31, 283–293.
- Lee, Y.-M., Seo, J.S., Jung, S.-O., Kim, I.-C., Lee, J.-S., 2006. Molecular cloning and characterization of O-class glutathione-S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with  $\alpha$ -class glutathione-S-transferase (GST-A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1053–1061.
- Liang, S., Chuang, L., Chang, M.-H., 2006. The Pet Trade as a Source of Invasive Fish in Taiwan. *Taiwania* 51, 93–98.
- Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Naccari, C., Martino, D., Calo, M., Naccari, F., 2005. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the straits of Messina (Sicily, Italy). *Environ. Monit. Assess.* 107, 239–248.
- Loebmann, D., Vieira, J.P., 2005. Distribuição espacial e abundância das assembléias de peixes no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. *Braz. J. Biol.* 22, 667–675.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 3-16.
- Masella, R., Benedetto, R. Di, Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement

- of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16, 577–586.
- Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Irene, M., Malagutti, A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips 158, 148–158.
- Merciai, R., Guasch, H., Kumar, A., Sabater, S., Garcia-Berthou, E., 2015. Trace metal concentration and fish size: Variation among fish species in a Mediterranean river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 154–161.
- Meschiatti, A.J., 1995. Alimentação da comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi-guaçu, SP. *Acta Limnologica Bras.* 7, 115–137.
- Meyer, J. S. (Ed.), 2005. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. Allen Press/ACG Publishing.
- Miller, P., Munkittrick, K., Dixon, D., 1992. Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates and tissues of white sucker (*Catostomus commersoni*) at metal-contaminated sites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 978-984.
- Moerland, T.S., 1995. Temperature: Enzyme and organelle. *Biochem. Mol. Biol. fishes* 5.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291–298.

- Niimi, A.J., Beamish, W.H., 1974. Bioenergetics and growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in relation to body weight and temperature. *Can. J. Zool.* 52, 447–456.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.*, 74, 3-9.
- Palaniappan, P.R., Sabhanayakam, S., Krishnakumar, N., Vadivelu, M., 2008. Morphological changes due to Lead exposure and the influence of DMSA on the gill tissues of the freshwater fish, *Catla catla*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2440–2444.
- Qiu, Y., Lin, D., Liu, J.-Q., Zeng, E.Y., 2011. Bioaccumulation of trace metals in farmed fish from South China and potential risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 284–93.
- Reynolds, W. W., Casterlin, M. E., 1980. The role of temperature in the environmental physiology of fishes. *Environ. Physiol. Fish.* 35, 497-518.
- Ribeiro, C.A.O., Pelletier, E., Pfeiffer, W.C., Rouleau, C., 2000. Comparative Uptake, Bioaccumulation, and Gill Damages of Inorganic Mercury in Tropical and Nordic Freshwater Fish. *Environ. Res.* 292, 286–292.
- Sabino, J., Castro R. M. C., 1990. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da Floresta Atlântica (sudeste do Brasil). *Rev. Bras. Biol.*, 50, 23-36.
- Schubert, I., Oud, J.L., 1997. There Is an Upper Limit of Chromosome Size for Normal Development of an Organism. *Cell* 88, 515–520.

- Shah, S.L., 2006. Hematological parameters in tench *Tinca tinca* after short term exposure to lead 223–228.
- Smet, H., Wachter, B., Lobinski, R., Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aqua. Toxicol.* 52, 269-281.
- Sohal, R.S., Mockett, R.T., Orr, W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 33, 575–586.
- Szebedinszky, C., McGeer, J.C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 597–607.
- Tong, S., Schirnding, Y.E. Von, Prapamontol, T., 2000. Environmental lead exposure : a public health problem of global dimensions 78, 5–10.
- Udroiu, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vinodhini, R., Narayanan, M., 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.) 6, 23–28.
- Vono, V., Barbosa, F.A.R., 2001. Habitats and littoral zone fish community structure of two natural lakes in southeast Brazil. *Environ. Biol. Fish* 61, 371–379.
- Vutukuru, S.S., Chintada, S., Madhavi, K.R., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y., 2006. Acute

- effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiol. Biochem.* 32, 221–229.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves . II . Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 125–137.
- Woodward, G., Friberg, N., Hildrew, A. G., 2009. The need for scientific rigour in biomonitoring and conservation of fresh waters. *Freshwater ecosystems: biodiversity, management and conservation*. Hauppauge, NY.
- Widianarko, B., Van Gestel, C.A.M., Verweij, R.A., Van Straalen, N.M., 2000. Associations between Trace Metals in Sediment, Water, and Guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from Urban Streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 101–107.
- Zeng, J., Yang, L., Wang, X., Wang, W., Wu, Q.L., 2012. Metal accumulation in fish from different zones of a large, shallow freshwater lake. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 116–124.
- Zhang, L., Wang, W.X., 2007. Size-dependence of the potential for metal biomagnification in early life stages of marine fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 787–794.