

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

**BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ELEMENTOS TRAÇOS  
ENCONTRADOS EM SERPENTES DO ESPÍRITO SANTO**

**ALEXANDRA FROSSARD**

**VILA VELHA-ES**  
**FEVEREIRO/2015**

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

**BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ELEMENTOS TRAÇOS  
ENCONTRADOS EM SERPENTES DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção grau de Mestre em Ecologia. Orientador: Prof. Dr. João Luiz Rossi Júnior. Coorientador: Prof. Dr. Levy de Carvalho Gomes.

**ALEXANDRA FROSSARD**

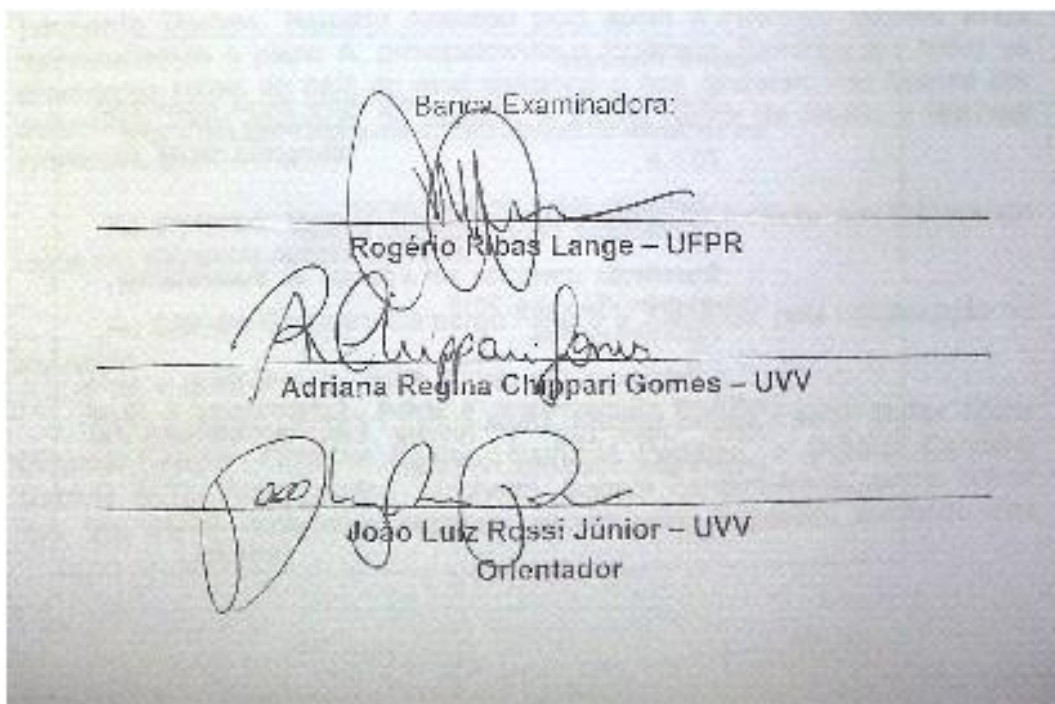
**VILA VELHA-ES**  
**FEVEREIRO/2015**

**ALEXANDRA FROSSARD**

**BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ELEMENTOS TRAÇOS  
ENCONTRADOS EM SERPENTES DO ESPÍRITO SANTO**

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015,



Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F938b Frossard, Alexandra.  
Bioacumulação de cádmio e elementos traços encontrados em serpentes do Espírito Santo / Alexandra Frossard. – 2015. 70 f.: il.  
Orientador: João Luiz Rossi Júnior.  
Co-orientador: Levy de Carvalho Gomes.  
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2015.  
Inclui bibliografias.  
1. Indicadores (Biologia). 2. Réptil – Espírito Santo. 3. Meio ambiente - Contaminação. 4. Metais - Contaminação. I. Rossi Júnior, João Luiz. II. Gomes, Levy de Carvalho. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 363.7

## AGRADECIMENTOS

Fui sondada por forças que me ergueram a cada dia durante esses anos de mestrado, contudo cada meta estabelecida com muita luta, essa força conduzia-me à vitória, não diferente, por isso, nesta conquista agradeço a Deus por cada passo que fui capaz de traçar.

Agradeço muito aos meus pais Alberto Alexandre e Dalila, e a minha irmã, Bruna, que sempre sonharam os meus sonhos e me apoiaram em minhas escolhas e conquistas.

Ao professor João Rossi, pela orientação e tão sonhada oportunidade de trabalhar com serpentes. O que nos proporcionou momentos de muito aprendizado com as várias tentativas de mantê-las em cativeiro.

Ao Professor Levy Gomes, pela co-orientação, luz e apoio em muitas dúvidas que foram surgindo antes, durante e depois de todo o experimento.

A professora Denise Coutinho Endringer por todo apoio e colaboração, e também por abrir portas em outras instituições para que fosse possível a realização do trabalho.

A professora Flaviana Lima Guião Leite por ter trazido as *Bothrops jaracas* abraçando a ideia de pesquisas com esses animais dentro da UVV.

Ao professor Renato Silveira Bérnils por confiar na pesquisa e nos incluir em sua autorização pra coletas.

A professora Adriana Regina Chippari Gomes pelas colaborações e dúvidas que conseguimos sanar juntos.

Aos professores do PPGEE, Ana Carolina Araújo, Alessandro Ramos, Leonardo Dobbss, Romildo Azevedo pelo apoio e incentivo quando ainda executaríamos o plano A, principalmente o Professor Romildo, e a todos os produtores rurais do café do qual visitamos e nos ajudaram nas buscas por serpentes. Sem esquecer da Janaina e Rafael Kunck de Souza e Raphael Honorato. Muito obrigada!

Ao professor Moacyr Carretta Jr. e o Mário do biotério, nos fornecendo ratos pra alimentar nossos animais.

Ao Cláudio Barberini Camargo Filho e a Samarco, pela colaboração na pesquisa.

Aos colegas Débora Cristina Alves, Mateus Simão, Fabian Müller, Maria Cristina Rangel, Thatiane Borline, Nathielle Pedroso, e Susana Carvalho Daniela Neris, Ana Carolina Tacchetto, Isabela Zandomênico, dentre outros que em vários momentos estavam alimentando, limpando, cuidando dos

animais E um obrigado muito especial para o amigo de todas as horas, Eduardo Lazaro, que foi o braço direito em tudo, são inúmeros agradecimentos.

Ao Carlos Roberto Paiva, Lourdinha e ao professor Marcel Ferreira Bastos Avanza, que em inúmeros momentos estavam com a gente, de alguma forma, cuidando das serpentes.

A todos do LabPeixe pelas horas respirando gases durante as digestões. Ao Vinícius Dadalto, Vinícius Dável, Alexandra Veronez e Jéssica Pereira pelas dúvidas, auxílios, troca de artigos e dicas para a melhora do trabalho, e principalmente ao Frederico Delunardo.

Aos amigos Márcio Mageski e Jordana Borine, Jordana Breda, Cinthia Cassotti, Bruna Pavesi e Fernanda Pavesi pelos auxílios estatísticos, troca de artigos e em alguns momentos até mesmo nas férias, cuidando dos animais.

À professora Maria Tereza Carneiro e seus alunos do LabPetro - Núcleo de Competência Química de Petróleo da UFES pela dedicação e disponibilidade nas análises das amostras.

À todos os amigos e familiares que sempre me apoiaram nessa jornada, entendendo minha ausência em muitos momentos de reuniões e alegrias. Parte das forças que tive, vieram de vocês...

À Universidade Vila Velha pela formação de excelência.

À FAPES pelo financiamento de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ELEMENTOS TRAÇOS ENCONTRADOS EM SERPENTES DO ESPÍRITO SANTO.....</b>	<b>07</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>08</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>09</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1: Concentração de elementos traços em serpentes do litoral e da região serrana do Espírito Santo.....</b>	<b>17</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>18</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>19</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>20</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>34</b>
<b>Referências .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 2: Efeitos da dieta com Cádmio na genotoxicidade, desempenho locomotor e bioacumulação de <i>Bothrops jararaca</i> (Squamata: Viperiadae).....</b>	<b>40</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>41</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>42</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>43</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>66</b>
<b>Referências .....</b>	<b>67</b>

## **RESUMO:**

FROSSARD, Alexandra. Universidade Vila Velha-UVV, Fevereiro de 2015.

**Bioacumulação de cádmio e elementos traços encontrados em serpentes do Espírito Santo.** Orientador: João Luiz Rossi Júnior; Co-orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Os elementos químicos, em sua maioria, encontram-se em ciclos bioquímicos e geoquímicos fechados e em concentrações que não causam efeitos nocivos aos organismos. Contudo, ações antrópicas aceleradas promovem alterações ambientais, como o aumento no aporte de contaminantes, a exemplo do carbono orgânico, nitrogênio e o fósforo considerados nutrientes, elementos traços e sedimentos resultantes de atividades industriais, agrícolas e da circulação de veículos automotores. Alguns metais, como por exemplo, o Zinco, o Ferro, o Manganês e o Cobre são elementos onipresentes, pelo menos em concentrações traço, e são essenciais para o metabolismo, na forma de micronutrientes. Outros, como o Chumbo e o Cádmio, não são necessários à vida das plantas e dos animais, embora existam na natureza, ou formando compostos complexos ou em sua forma elementar. Os elementos traços, quando encontrados em concentrações anormais, se inserem em um grupo de substâncias denominadas desreguladoras endócrinas, uma categoria recente de poluentes ambientais que se caracterizam por interferir na funcionalidade do sistema endócrino. Há uma preocupação considerável sobre os níveis de contaminantes nos organismos e seus ecossistemas, particularmente para espécies em níveis tróficos superiores. Algumas espécies possuem hábitos biológicos que aumentam a probabilidade de exposição aos contaminantes, produzindo, desse modo, informações relevantes que seriam perdidas, se apenas amostras abióticas fossem analisadas. Para a avaliação do grau de exposição à poluição em que os organismos de uma região são expostos utilizam-se espécies denominadas bioindicadoras. Répteis podem servir como bioindicadores úteis porque muitas espécies são generalistas, tem vida relativamente longa, ocorrem em uma variedade de habitats e ocupam diferentes níveis tróficos.

**Palavras Chaves:** Bioindicadores, contaminantes ambientais, répteis.



## **ABSTRACT:**

FROSSARD, Alexandra. University Old UVV-Vila, February 2015. **Cadmium Bioaccumulation and trace elements found in the Holy Spirit snakes.**

Advisor: João Luiz Rossi Junior; Co-advisor: Levy de Carvalho Gomes.

Chemical elements, mostly, are in closed biochemical and geochemical cycles and at concentrations that do not cause harm to organisms. However, accelerated human actions promote environmental changes, such as increasing the contribution of contaminants, such as organic carbon, nitrogen and phosphorus nutrients considered, trace elements and sediment resulting from industrial, agricultural and circulation of motor vehicles. Some metals, such as zinc, iron, manganese and copper are ubiquitous elements in at least trace concentrations, and are essential to metabolism in the form of micronutrients. Others, such as lead and cadmium, are not necessary for the life of plants and animals, although there are in nature, or forming complex compounds or in its elemental form. Trace elements, as found in abnormal concentrations fall into a group of substances called endocrine disrupting a new class of environmental pollutants which are characterized by affecting the endocrine system functionality. There is considerable concern about the levels of contaminants in organisms and their ecosystems, particularly for species at higher trophic levels. Some species have biological habits that increase the likelihood of exposure to contaminants, producing thereby important information that would be lost if only abiotic samples were analyzed. For the evaluation of the degree of exposure to pollution in the bodies of a region are exposed are used species known as bioindicators. Reptiles can serve as useful biomarkers because many species are generalists, have relatively long life, occur in a variety of habitats and occupy different trophic levels.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os elementos químicos, em sua maioria, encontram-se em ciclos bioquímicos e geoquímicos fechados e em concentrações que não causam efeitos nocivos aos organismos. Contudo, ações antrópicas aceleradas promovem alterações ambientais, como o aumento no aporte de contaminantes, a exemplo do carbono orgânico, nitrogênio e o fósforo considerados nutrientes, elementos traços e sedimentos resultantes de atividades industriais, agrícolas e da circulação de veículos automotores (Martins, 2008; Goonetilleke et al., 2005; Pascalicchio, 2002).

Os problemas ambientais causados por contaminantes químicos são de natureza orgânica ou inorgânica. Os poluentes inorgânicos são aqueles de origem mineral e os orgânicos são aqueles provenientes da decomposição de animais e vegetais, e podem ser sintetizados pelo homem (Alcântara, 1985).

Sobre os poluentes inorgânicos, os elementos traços são os mais frequentes nos solos urbanos e agrícolas, sendo que, os mais comumente encontrados são Cobre, Chumbo, Zinco, Cádmio e Níquel (Pedron et al., 2004). Por serem demasiadamente estáveis na natureza os metais podem ser acumulados no solo, nos sedimentos ou nos sistemas biológicos (Allen et al., 1993). Em consequência dessa estabilidade e escassez na natureza os elementos traços são considerados indicadores de poluição (Peláez-Rodríguez, 2001).

De acordo com Carapeto (2012), Förstner e Wittmann (1983), levando em consideração a potencial poluição ambiental, os elementos traços podem ser classificados como 1- não críticos, 2- tóxicos, mas muito insolúveis ou muito raros, 3- muito tóxicos e relativamente acessíveis. Todos são considerados unidades químicas que possuem capacidade de bioacumulação e biomagnificação nos organismos vivos e persistência no ambiente (Tavares e Carvalho, 1992). A bioacumulação é caracterizada quando o organismo absorve o composto químico do meio abiótico ou biótico (Leblanc, 1995). Já a biomagnificação ocorre quando a concentração desse composto químico se eleva ao longo da cadeia alimentar (Reinfelder, 1999). Ambas se encarregam de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas

para diferentes espécies. Devido a grande capacidade de persistência dos elementos traços, o efeito ao organismo vivo é garantido, em longo prazo, mesmo após a interrupção das emissões (Tavares e Carvalho, 1992).

Alguns metais, como por exemplo, o Zinco, o Ferro, o Manganês e o Cobre são elementos onipresentes, pelo menos em concentrações traço, e são essenciais para o metabolismo, na forma de micronutrientes. Outros, como o Chumbo e o Cádmio, não são necessários à vida das plantas e dos animais, embora existam na natureza, ou formando compostos complexos ou em sua forma elementar (Carapeto, 2012).

Os elementos traços, quando encontrados em concentrações anormais, se inserem em um grupo de substâncias denominadas desreguladoras endócrinas, uma categoria recente de poluentes ambientais que se caracterizam por interferir na funcionalidade do sistema endócrino. A esses poluentes são atribuídas suspeitas de efeitos adversos à saúde animal, como perda de peso, distúrbios comportamentais, danos a diversos órgãos e, em alguns casos, inclusive, esses efeitos podem levar ao declínio populacional (Bila e Dezotti, 2007; Hueza et al., 2008).

O aumento da utilização de defensivos agrícolas, tais como Aldrin e DDT (Ziolly et al., 1995), que possuem Cádmio e outros elementos traços em suas composições (Corbi et al., 2005), favorecem o carreamento de elementos traços para os rios, contaminam a água, o solo e os alimentos (Guilherme et al., 2005). Estes agroquímicos sofrem processos de bioacumulação em diferentes níveis tróficos, concentrando-se na gordura de peixes, crustáceos, aves e outros animais terrestres (Siqueira e Braga, 2000; Odum, 1988) e, principalmente, em organismos do topo da cadeia trófica como é o exemplo de algumas serpentes (Barcelo e Poschenrieder, 1992; Margalet, 2004; Rissato et al., 2004).

Há uma preocupação considerável sobre os níveis de contaminantes nos organismos e seus ecossistemas, particularmente para espécies em níveis tróficos superiores (Burger e Gochfeld, 2000). Algumas espécies possuem hábitos biológicos que aumentam a probabilidade de exposição aos

contaminantes, produzindo, desse modo, informações relevantes que seriam perdidas, se apenas amostras abióticas fossem analisadas.

Para a avaliação do grau de exposição à poluição em que os organismos de uma região são expostos utilizam-se espécies denominadas bioindicadoras (Loppi et al., 1998). Por isso, existe uma procura por espécies que podem servir como bioindicadores de poluentes ambientais e de técnicas de amostragem não destrutiva, bem como os dados comparativos sobre contaminantes em locais diferentes utilizando a mesma espécie. Bioindicadores são fundamentais tanto para avaliar a situação e as tendências de contaminação em uma ampla escala geográfica e temporal (Piotrowski, 1985; Peakall, 1992; Burger e Gochfeld, 2001; Carignan e Villard, 2001), quanto para avaliar a exposição e os efeitos críticos (Burger, 2006).

Para ser biologicamente relevante, um indicador deve apresentar mudanças em resposta a um estressor, mas não ser tão sensível às mudanças que ocorram quando não há motivo para preocupação, ou indiquem variações triviais ou sem importância biológica (O'Connor e Dewling, 1986). Desta forma, as mudanças devem ser atribuídas a um estressor particular, e passivo de comprometimento de outras espécies e populações dentro do mesmo ecossistema (Linthurst et al., 1995).

O elemento-chave para um bom bioindicador é o reconhecimento da sua importância biológica, e ele também deve ser metodologicamente relevante (Burger e Gochfeld, 2001), além de ser facilmente acessado, para que os gestores e os reguladores os empreguem em mandatos de conformidade. Facilidade de medida é uma característica chave e inclui aspectos como nos objetivos de clareza e facilidade de identificação de características importantes e facilidade de coleta de dados e análise (Fox, 1994; Fox et al., 1991). Além disso, a sociedade deve estar disposta a pagar, tanto para a implementação de um bioindicador quanto para agir sobre os resultados, para que ele se torne uma referência de estudo.

Répteis podem servir como bioindicadores úteis porque muitas espécies são generalistas, tem vida relativamente longa, ocorrem em uma variedade de habitats e ocupam diferentes níveis tróficos (Bauerle et al., 1975; Heinz et al.,

1980; Hopkins et al., 1999, Campbell e Campbell, 2001). No entanto, os répteis são raramente incluídos nos estudos de contaminação ambiental e avaliação de riscos ecológicos, embora existam dados sobre os níveis de contaminantes nesta classe de vertebrados (Burger, 1992; Campbell e Campbell, 2002; Clark et al., 2000; Burger et al., 2002; Frossard et al., 2013).

De acordo com Burger et al. (2007), as espécies que ocupam diversos níveis tróficos, são mais vulneráveis a contaminação por elementos traços e desempenham um papel muito importante como indicadores de contaminação ambiental (Crain e Guillette, 1998).

O uso de serpentes selvagens como bioindicadores ambientais oferece informações importantes sobre os efeitos de poluentes sobre estes animais e até sobre as populações humanas (Bauerle et al., 1975; Stafford et al., 1976; Burger, 1992; Hopkins et al., 1999; Burger et al., 2007). É importante salientar que não se conhece as concentrações destas substâncias em serpentes no Estado do Espírito Santo e em grande parte do território brasileiro e que isto pode refletir uma medida de contaminação ambiental que pode acometer seres humanos, uma vez que as espécies estudadas vivem em áreas antropizadas.

Portanto, os contaminantes ambientais que são onipresentes, como os elementos traços, podem influenciar quase todos os aspectos da ecologia e do comportamento dos animais de vida livre e também dos animais cativos, através dos seus efeitos fisiológicos, ocasionando danos à saúde e comprometendo as taxas de reprodução e sobrevivência das espécies, podendo alterar a dinâmica populacional (Hueza et al., 2008).

Por isso, estudos fisiológicos em animais silvestres, ou que foram recentemente capturados e até mesmo os animais cativos, são importantes para a obtenção de dados básicos da sua fisiologia podendo ser utilizados como uma ferramenta de diagnóstico ambiental. Neste caso, o sangue é um dos primeiros tecidos a serem estudados devido a sua capacidade de transportar gases e nutrientes, além de ser uma via de eliminação dos catabólitos pelo metabolismo (Zago et al., 2010). Por outro lado, estudar os diferentes tecidos permite verificar as vias metabólicas de acumulação dos elementos traços nos tecidos das serpentes. Porém, estudos ecotoxicológicos

são mais comuns em peixes (Van der Oost et al., 2003); sendo escassos em répteis, principalmente em serpentes (Silva et al., 2008; Brites e Rantin, 2004; Ferronato, 2008, Zago et al., 2010; Burger et al., 2010).

Diante de todo o exposto, o presente trabalho buscou avaliar a contaminação ambiental em serpentes de vida livre, partindo-se da hipótese de que as mesmas refletem os níveis de contaminação dos locais estudados. Concomitantemente, um experimento com animais cativos foi realizado com exposição ao Cádmio para avaliação de contaminação via cadeia trófica, com o objetivo de analisar a presença do metal nos tecidos de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

## REFERÊNCIAS:

- Alcântara, H.R., 1985. **Toxicologia clínica e forense**. 2. ed. São Paulo: Organização Andrei LTDA, 427p.
- Allen, H.E., Fu, G., Deng, B., 1993. Analysis of Acid-Volatile Sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the Estimation of Potential toxicity in Aquatic Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1441-1453.
- Bila, D.M., Dezotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, 30: 651-666.
- Burger J., Campbell K. R., Murray S., Campbell T. S., Gaines K. F., Jeitner C., Shukla T., Burke S., Gochfeld, M., 2007. Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina *V 373*, 2–3, p 556–563.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2000. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. *J. Toxicol. Environ. Health B* 3, 59–78.
- Bauerle B., Spencer D.L., Wheeler W., 1975. The use of snakes as a pollution indicator species. *Copeia* :366–8.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo Planta, Madrid*, n. 2, p. 345.
- Brites, V. L. C., Rantin, F. T., 2004. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha River. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96: 273-281.
- Burger, J., 1992. Trace element levels in pine snake hatchlings: tissue and temporal differences. *Arch Environ Contam Toxicol*; 22:209–13.
- Burger, J., 2006. Neurotoxicology and behavioral effects in reptiles. In: Gardner SC, Oberdorster E, editors. *Toxicology of reptiles*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; p. 173–98.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2001. On developing bioindicators for human and ecological health. *Environ Monit Assess*;66:23–46.
- Burger, J., Gochfeld, M., Rooney, A.A., Orlando, E.F., Woodward, A.R., Guillette Jr., L.J., 2002. Metals and metalloids in tissues of American alligators in three Florida lakes. *Arch Environ Contam Toxicol*;38:501–8.
- Burger, J., Campbell, K.R., Campbell, T.S., Shukla, T., Jeitner, C., Gochfeld, M., 2005. The use of skin and blood as non-destructive indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Archiv Environ Contam Toxicol*;49:232–8.
- Burger, J., Jeitner, C., Schneider, L., Vogt, R. C., Gochfeld, M., 2010. Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Selenium levels in blood of four species of turtles from the Amazon in Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 73: 33-40.

Campbell, K.R., Campbell, T.S., Burger, J., 2005. Heavy metal concentrations in Northern Water Snakes (*Nerodia sipedon*) from East Fork Poplar Creek and the Little River, East Tennessee, USA. *Archiv Environ Contam Toxicol*;49:239–48.

Campbell, K.R., Campbell, T.S., 2001. The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. *Environ Monit Assess*;70:253–301.

Campbell, K.R., Campbell, T.S., 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. *Environ Toxicol Chem*;21:894–8.

Carapeto, C. Metais pesados. Disponível em < <http://www.antoniofonseca.com/Unidades%20Curriculares/2-Ano/Poluicao/1%20Licoes/13%20-%2014%20-%2015/METAIS.pdf> > Acesso em 15 dez 2012.

Carignan, V. Villard, M.A., 2001. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environ Monit Assess*;78:45–61.

Clark Jr., D.R., Bickham, J.W., Baker, D.L., Cowman, D.F., 2000. Environmental contaminants in Texas, USA, wetland reptiles: evaluation using blood samples. *Environ Toxicol Chem*;19:2259–65.

Corbi, J.J., Strixino, S.T., Santos, A., Grande, M.D., 2006. Diagnóstico Ambiental De Metais e Organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado De São Paulo, Brasil) *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 61-65.

Dabrowska, H., Fisher, S.W., Dabrowski, K., Staubus, A.E., 1996. Dietary uptake efficiency of hcbp in channel catfish: The effect of fish contaminant body burden. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 746–749.

Du, W.G., Ji, X., 2003. The effects of incubation thermal environments on size, locomotor performance and early growth of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Journal of Thermal Biology* 28: 279–286.

Ferronato, B.O., 2008. *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral. Dissertação de mestrado em ecologia aplicada, ESALQ/USP, 164p.

Fox, G.A., Gilbertson, M., Gilman, A.P., Kubiak, T.J., 1991. A rationale for the use of colonial fish-eating birds to monitor the presence of developmental toxicants in Great Lakes fish. *J Great Lakes Res*;17:151–2.

Freedberg, S., Ewert, M.A., Nelson C.E., 2001. Environmental effects on fitness and consequences for sex allocation in a reptile with environmental sex determination. *Evolutionary Ecology Research* 3: 953–967.

Freedberg, S., Stumpf, A.L., Ewert, M.A., Nelson, C.E., 2004. Developmental environment has long-lasting effects on behavioural performance in two turtles with environmental sex determination. *Evolutionary Ecology Research* 6: 739–747.

Förstner, U., Wittmann, G.T.W., 1983. Metal pollution in the aquatic environment. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 230p.

Frossard, A., Ferreira, P.D., Carneiro, M.T.W.D., Heringer, D.C., Endringer, O.A., Gomes, L.C., 2013. Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. *Aquatic Toxicology* 140– 141, 239– 241.



- Goonetilleke, A., Thomas, E., Ginn, S., Gilbert, D., 2005. Understanding the role of land use in urban storm water quality management. *Journal of Environmental Management*, 74: 31-42.
- Guilherme, L.R.G., Marques, J.J., Pierangeli, M.A.P., Zuliani, D.Q., Campos, M.L., Marchi, G., 2005. Elementos-traço em solo e sistemas aquáticos. *Tópicos Ci. Solo*, 4:345-390.
- Heinz, G., Haseltine, S.D., Hall, R.J., Krynitsky, A.J., 1980. Organochlorine and mercury residues in snakes from Pilot and Spider Islands, Lake Michigan-1978. *Bull Environ Contam Toxicol*; 25:738-43.
- Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Congdon, J.D., 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snake (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environ Toxicol Chem*; 18:1258-63.
- Hueza, I.M., Sant'anna, M.G., Palermo-Neto, J., 2008. Toxicologia do chumbo, mercúrio, arsênio e outros metais. In: Spinosa, H.S.; Górnica, S.L.; Palermo-Neto, J (Ed.). *Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária*. São Paulo. Manole, P. 641-662.
- Leblanc, G.A., 1995. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. *Environmental Science and Technology*, 29: 154-160.
- Linthurst, R.A., Bourdeau, P., Tardiff, R.G., 1995. *Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems*. Chichester, UK: Wiley & Sons.
- Martins, A.I.P., 2008. Redução da qualidade do ambiente com reflexos na disponibilidade e qualidade do alimento, redução dos abrigos e da Biodiversidade. Dissertação de Mestrado em Sustentabilidade em Ecossistemas. Universidade Federal do Maranhão.
- O'Connor, J.S., Dewling, R.T., 1986. Indices of marine degradation: their utility. *Environ Manage*; 10:335-43.
- Odum, E.P., 1988. *Ecologia*, Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 434 p.
- Oliveira, C.P.F., 2003. Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação De Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio INPA/UFAM. 82p.
- Peakall, D., 1992. *Animal biomarkers as pollution indicators*. London: Chapman & Hall Ecotoxicology Series. 2-6. 21p.
- Pascalichio, A.E., 2002. *Contaminação por metais pesados: Saúde Pública e Medicina Ortomolecular*. São Paulo. Annablume Editora. Ed 1. 134p.
- Pedron, F.A., Dalmolin, R.S.D., Azevedo, A.C., Kaminski, J., 2004. Solos urbanos. *Ciência Rural*, 34: 1647-1653.
- Peláez-Rodríguez, M., 2001. Avaliação da qualidade da água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu-SP (Ribeirão do Feijão e Ribeirão do Monjolinho) através de 11 variáveis Físicas, Químicas e Biológicas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, SP, 175p.
- Piotrowski, J.K., 1985. Individual exposure and biological monitoring. In: Vouk VB, Butler GC, Hoel DG, Peakall DB, editors. *Methods for estimating risk of chemical injury: human and non-human biota and ecosystems*. Chichester, UK: Wiley & Sons; p. 123-35.

Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., Luoma, S.N., Nichols, J.W., Wang, W.X.W., 1999. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Science of the Total Environment*, 219: 117-135.

Rhen, T., Lang, J.W., 1995. Phenotypic plasticity for growth in the common snapping turtle: effects of incubation temperature, clutch, and their interaction. *American Naturalist* 146: 726–747.

Rissato, S.R., Libânio, M., Giafferis, G.P., Gerenutti, M., 2004. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). *Quim. Nova*, 27, 739.

Rodrigues, M.T., 2005. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. *Megadiversidade*, 1(1): 87-94.

Schneider, L., Belger, L., Burger, J., Vogt, R.C., 2009. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. *Science of the Total Environment*. 407: 1048-1054.

Siqueira, G.W., Braga, E.S., 2000. *Ecotoxicologia perspectivas para o século XXI*, Rima ed.: São Carlos, p. 241.

Silva, I.A., Bonini-Domingos, C.R., Oliveira, M.T.V.A., Zago, C.E.S., Venancio, I.P.R., 2008. Environmental influence in physiology and adaptation of population "geoffroy'ssideneck" (*Phrynops geoffroanus* testudines: Chelidae). *Holos Environment* 8 (2).

Schmid, W., 1975. The micronucleus test, *Mutat.Res.* 31. 9–15. PubMed – Medline. <<http://garfield.library.upenn.edu/classics1990/A1990EL74900001.pdf>>

Stafford, D.P., Plapp J.r, F.W., Fleet, R.R., 1976. Snakes as indicators of environmental contamination: relation of detoxifying enzymes and pesticide residues to species of occurrence in three aquatic systems. *Arch Environ Contam Toxicol*;5:15–27.

Tavares, T.M., Carvalho, F.M., 1992. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no Recôncavo Baiano. *Química Nova*. 15 (2) 147-154.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

Zago, C.E., Ferrarezi, A.L., Vizotto, L.D., Oliveira, C., Cabral, S.R., Taboga, S.R., Bonilla-Rodriguez, G.O.; Venancio, L.P.; Bonini-Domingos, C.R., 2010. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 9: 721-726.

Zioli, R.L., Barreto, A.S., Jardim, W.F., 1995. 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e 7º Encontro Brasileiro de Fotoquímica e Fotobiologia (Anais), Caxambu, Brasil,

CAPÍTULOS

Capítulo 1:

**CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS EM SERPENTES DO  
LITORAL E DA REGIÃO SERRANA DO ESPÍRITO SANTO**

## RESUMO

FROSSARD, Alexandra. Universidade Vila Velha – UVV- Fevereiro de 2015.

**Concentração de elementos traços encontrados em serpentes do litoral e da região serrana do Espírito Santo.** Orientador: João Luiz Rossi Júnior; Co-orientador: Levy de Carvalho Gomes

O presente trabalho buscou caracterizar a presença aos elementos traços em duas espécies de serpentes comuns na região sudeste, *Boa constrictor* e *Bothrops jararaca*. Foram analisados fragmentos de rim, de espécimes necropsiados. As serpentes estudadas foram provenientes de atropelamentos ocorridos no trecho da Rodovia ES-060 que vai do Km 0 até o Km 67,5, em Meaípe, conhecido como Rodovia do Sol no estado do Espírito Santo, Brasil que posteriormente foram encaminhadas para o Laboratório de Anatomia Animal, da Universidade Vila Velha (UVV-ES), nos anos de 2013 à 2014. As serpentes provenientes da Região Serrana do Espírito Santo, eram encontradas pela comunidade e entregues ao Criador Comercial de Serpentes Nikel, que fez o encaminhamento dos animais, mediante autorização do IBAMA-ES. A quantificação dos metais (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) foi realizada por espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Foram obtidos um total de 36 amostras, divididas em 02 espécies. Os viperídeos, representados pelas 18 *Bothrops jararaca* de vida livre, encontradas por fazendeiros da região serrana do Estado, e os bóídeos, representados por 18 *Boa constrictor* da região litorânea. Todos tiveram o rim como tecido biológico analisado apresentando elevadas concentrações de substâncias inorgânicas tóxicas, como o Pb e Cd e que algumas das duas espécies estudadas, apresentam concentrações consideradas letais para o elemento Pb.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental, bioacumulação, *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*.

## ABSTRACT

FROSSARD, Alexandra. University Vila Velha - UVV-February 2015. **Concentration of trace elements found in coastal snakes and mountainous region of the Espírito Santo.** Advisor: João Luiz Rossi Jr; Co-advisor: Levy de Carvalho Gomes.

This study aimed to characterize the presence trace elements in two species of snakes common in the Southeast, *Boa constrictor* and *Bothrops jararaca*. Kidney fragments were analyzed, of autopsied specimens. The snakes were studied from trampling occurred in the stretch of the ES-060 that goes from Km 0 to Km 67.5 in Meáípe, known as the Sun Highway in the state of Espírito Santo, Brazil which were subsequently forwarded to the Laboratory Animal Anatomy, University of Vila Velha (UVV-ES) in the years 2013 to 2014. The snakes from the mountainous region of the Holy Spirit, were found by the community and delivered to the Commercial Creator Snakes Nikel, who made the referral of animals, by the IBAMA-ES. The quantification of metal (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) was carried out by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). There was obtained a total of 36 samples were divided into 02 species. The viperid, represented by 18 *Bothrops jararaca* free life, found by farmers of the state's mountain region, and bóíds, represented by 18 *Boa constrictor* in the coastal area. All had kidney as biological tissue analysis showing high concentrations of toxic inorganic substances such as Pb and Cd and some of the two species have considered lethal concentrations for Pb.

**Keywords:** environmental contamination, bioacumulation, *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*.

## INTRODUÇÃO

A degradação ambiental provocada pelo avanço das fronteiras agrícolas, atividade industrial e extração de petróleo afetam negativamente indivíduos e ecossistemas inteiros em todo o mundo, mesmo em áreas relativamente livres da intervenção antrópica, devido à dispersão global pela água e ar (Iwata et al., 1993; Oehme, 1991). Inúmeros efeitos deletérios têm sido causados ao meio ambiente devido à urbanização acelerada e sem planejamento adequado (Pusch, 2007). A alteração ou perda de habitat natural ou mesmo a redução da qualidade do ambiente é uma das consequências do crescimento urbano, e apresenta importantes implicações ecológicas, como os reflexos diretos na disponibilidade e qualidade do alimento (Schneider et al., 2009), uma vez que as espécies diferem em sua capacidade de se adaptarem ao desenvolvimento humano (Minor e Urban, 2010).

O avanço da fronteira agropecuária, extrativista e urbana gera uma perda gradual e contínua dos ambientes terrestres, afetando os recursos hídricos e nichos ecológicos a eles associados (Martins, 2008). Alguns organismos sofrem, primeiramente, com os efeitos que podem ser diretos, devido, por exemplo, à retirada das matas de galeria ou indiretos como a poluição e contaminação por meio do lixo industrial, doméstico, urbano ou de produtos agroquímicos (Rodrigues, 2005) e das águas de formação associadas à extração de petróleo (Oliveira, 2003).

Por serem usados demasiadamente nas atividades industriais, e por estarem presentes em defensivos agrícolas, os elementos traços podem ser responsáveis pela contaminação do meio ambiente e estão disponíveis para biomagnificação através do ar e da água (Ziolly et al, 1995; Lagadic et al, 1998). Como resultado da contaminação, as serpentes podem acumular níveis elevados destes metais, e de acordo com Burger et al (2007), uma vez disponíveis no organismo desses répteis, estes elementos podem ser acumulados, principalmente em tecidos biológicos como músculos, rim, fígado e ponta de cauda.

Os organismos que vivem em zonas urbanas, industrializadas e rurais possuem risco potencial de serem expostos a elementos traços (Loumbourdis,

1997). Como uma resposta a esse risco, os estudos com elementos traço têm se concentrado na ponderação dos efeitos nos organismos e nos ecossistemas (Oliveira et al., 1999). Uma forma muito comum de contaminação em áreas com influências antrópicas é por meio de elementos traços liberados por veículos automotores. O tráfego destes veículos libera metais através de desgaste de pneus e freios, vazamento de óleos e emissões gasosas (Sörme et al., 2002; Lough et al., 2005). A abundância desses contaminantes se relaciona ao volume do tráfego, à idade da frota e ao tipo de combustível empregado (Wanielista e Youself, 1993).

As proteções de aço nas rodovias, as placas de sinalização (galvanizadas, recobertas com Zinco) e as peças e baterias de automóveis também são fontes de elementos traços. Escapamentos de automóveis emitem poluentes, como Óxidos de Nitrogênio, Dióxido de Enxofre, Hidrocarbonetos, Dióxido e Monóxido de Carbono, aldeídos e material particulado (fuligem, poeira, fumaça e todo material suspenso no ar). Derramamentos de produtos químicos de caminhões e automóveis também são fontes de poluição química de estradas. Esses contaminantes em concentrações elevadas podem causar problemas fisiológicos e acumulativos nos animais e plantas (Spellerberg, 1998).

Outra forma de contaminação é a aplicação constante de agroquímicos sobre o solo (Ramalho et al., 2000). Esta é uma prática comum nas áreas rurais para a proteção de lavouras para o controle de pragas, prática esta que causa a degradação química do solo e o acúmulo de elementos traços, principalmente o Manganês, Arsênio, Cobre, Zinco, Cobalto e Chumbo (Gimeno-Garcia et al, 1996), componentes ativos de vários agroquímicos (Tiller, 1989). Já os fertilizantes minerais e orgânicos, bem como os corretivos do solo, contêm Zn, frequentemente como impurezas (Kiekens, 1990) que também atuam nas concentrações desses elementos no solo (Ramalho et al., 2000), além de colaborar para a transferência desses poluentes na cadeia alimentar, assim como outros meios alternativos de convivência com os problemas gerados pelos excessos ocorridos (Oliveira et al., 1999).

As intoxicações por elementos traços mais frequentemente relatadas em serpentes estão associadas ao Selênio. Entretanto, outros metais que

intoxicam os répteis são o Arsênio, Chumbo, Cádmio, Cromo, Mercúrio e Ferro (Hopkins et al., 2001; Burger et al., 2007). A detecção de elementos traços tem sido particularmente bem documentada para as cadeias alimentares aquáticas (Silva et al., 2015; Chovanec et al., 2003), mas apesar de serem reconhecidas como espécies bioindicadoras, os répteis ainda são carentes de estudos relacionados a teores de elementos traços (Hopkins et al., 2001; Burger et al., 2007), sejam animais de vida livre quanto cativos.

Deve-se considerar que a captura de animais de vida livre, como serpentes, envolve diversos fatores de riscos e dificuldades. Portanto, empregar métodos menos invasivos, como por exemplo, a utilização de animais provenientes de atropelamentos ou capturados e mortos por proprietários rurais e então encaminhados pelos órgãos ambientais, pode fornecer informações importantes sobre a ecologia das espécies, como a frequência de exposição aos contaminantes e a bioacumulação destes (Campbell et al., 2005).

Diante de todo o exposto, o presente trabalho visa caracterizar a exposição aos elementos traço (Cádmio-Cd, Cobalto-Co, Cromo-Cr, Cobre-Cu, Ferro-Fe, Manganês-Mn, Níquel-Ni, Chumbo-Pb e Zinco-Zn) de duas espécies de serpentes da Grande Vitória e da Região Serrana/ES, analisando frações de rim de espécimes necropsiados, partindo da hipótese de que as mesmas refletem os níveis de contaminação dos locais estudados, podendo então ser considerada um bioindicador ambiental.



## MATERIAIS E MÉTODOS

Serpentes da espécie *Boa constrictor* (jiboia) estudadas (n=18), foram provenientes de atropelamentos ocorridos no trecho da Rodovia ES-060 que vai do Km 0, da Ponte Castelo Mendonça, em Vitória, até o Km 67,5, em Meaípe, conhecido como Rodovia do Sol no estado do Espírito Santo, e entregues ao Laboratório de Anatomia Animal, da Universidade Vila Velha (UVV-ES), nos anos de 2013 à 2014. (A licença do IBAMA nº 19/06, do processo n.º 02009.000499/01-82) e o do IEMA nº 67699286/20014)

Serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (jararaca) estudadas (n=18), foram encaminhadas pela comunidade rural do entorno do Criadouro Comercial de Serpentes Nickel, e posteriormente encaminhadas para pesquisa, por intermédio do IBAMA/ES. O Criador encontra-se em Melgaço, Distrito de Domingos Martins, Estado do Espírito Santo, Brasil. (Número de autorização 002/14-NUFAU/DITEC/IBAMA/ES). Todas as serpentes vivas foram ambientadas e alojadas no Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário Professor Dr. Ricardo Alexandre Hippler da UVV.

### *Área de estudo:*

A Rodovia do Sol atravessa os municípios de Guarapari e Vila Velha. Esta região compreende um clima tropical chuvoso com temperatura média de 18º C, sendo fevereiro e julho os meses mais quente e frio, respectivamente. A vegetação marginal da rodovia é composta, principalmente por Restinga, a qual é considerada uma área fundamental para a biodiversidade, em espécies vegetais e animais presentes em grande parte da área adjacente à rodovia (INCAPER, 2015). Ao longo do Sistema Rodovia do Sol existem três importantes reservas ambientais: Parque Natural Municipal de Jacarenema, Área de Preservação Ambiental de Setiba e Parque Estadual Paulo César Vinha (IPEMA, 2004). Por estarem numa área de grande pressão antrópica, é necessário que exista um trabalho efetivo de educação ambiental nessas reservas.

O Município de Domingos Martins encontra-se na região central e serrana do Espírito Santo, com relevo acidentado, montanhoso, a cerca de 540 m de altitude. O clima é tropical de altitude com temperatura média anual inferior a 20° C devido à altitude do seu relevo (90% acima de 500 m). Está localizado à latitude Sul de 20° 21' 44" e longitude Oeste de Greenwich de 40° 39' 36" e possui uma área de 1.228,353 Km<sup>2</sup>, distando 43 km de Vitória. A vegetação predominante na região é a floresta ombrófila densa antimontana, com apenas uma unidade de conservação, o Parque Estadual de Pedra Azul com uma área de 1.240 hectares, localizada no distrito de Aracê. Porém, por Domingos Martins ser uma área de relevante interesse ecológico, todo o município faz parte do Corredor Central da Mata Atlântica, e por ser uma área prioritária de conservação da Mata Atlântica no Espírito Santo faz parte do Corredor Ecológico Pedra Azul x Forno Grande (PMPEPA, 2004). Seu atual desenvolvimento se deve ao turismo e à agricultura, com o café e hortifrutigranjeiros (IBGE, 2014; PMSDM, 2013). Muitos proprietários e trabalhadores rurais que se situam nas proximidades, são responsáveis por recolher e enviar serpentes para o criador comercial de Melgaço, distrito do município.

#### *As serpentes:*

As *Boa constrictor*, da família Boidae, possuem ampla distribuição na América do Sul, e habitam áreas florestadas e também urbanas (Carvalho e Nogueira, 1998). Podem ser terrestres e semi-arborícolas e geralmente são ativas à noite, possuem receptores térmicos labiais, sensíveis a raios infravermelhos emitidos pela presa em potencial, e quando capturadas, são mortas por constrição. As serpentes possuem adaptações cranianas que permitem a ingestão de presas relativamente grandes, e itens alimentares consumidos são geralmente baseados em aves e mamíferos, podendo se alimentar também de lagartos e anfíbios (Scartozzoni e Molina, 2004). Como foram obtidos, 10 exemplares de fêmeas de *Boa constrictor* e 8 exemplares de machos, analisamos a bioacumulação dos elementos traços nos rins entre o sexo dessa espécie.

As *Bothrops jararaca*, da família Viperidae, tem distribuição ampla e associada ao domínio da Mata Atlântica, estendendo-se por ambiente florestais e áreas antropizadas. Com hábitos principais, terrestres e noturnos, se alimentam basicamente de roedores (Hartmann et al., 2003). Possui em sua dentição aparelho inoculador do tipo solenóglifo e se caracteriza por possuir cabeça triangular recoberta por escamas pequenas e presença de fosseta loreal. As serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares (Cardoso et al., 2009).

As *Bothrops jararacas* adquiridas Criadouro Comercial de Serpentes Nickel, foram acomodadas em “serpentários” improvisados para realização de manejo intensivo, criado pra receber um variado número de espécies de animais silvestres, provenientes de diversos climas, em uma área bastante reduzida. Proporcionamos uma forma simples de manutenção, com facilidade para a vigilância dos animais, em relação à alimentação e para o controle dos fatores ambientais como temperatura e umidade. Esse sistema, porém, com espaço reduzido, apresentou desvantagens, como a impossibilidade das serpentes realizarem termorregulação apropriada, obrigando a uma climatização em parâmetros não adequados para todos os espécimes. A falta de contato com elementos naturais não permitiu um perfeito equilíbrio fisiológico das serpentes. Isso se tornou evidente pela facilidade com que os animais adoeceram, e morreram, talvez também o surgimento de enfermidades contagiosas que, não diagnosticamos e portanto não as controlamos. Além de tudo, os animais não passaram por quarentena, como em outros serpentários. Além desses, vários foram os motivos para as mortes da *B. jararaca*, como lesões traumáticas, às vezes de bastante gravidade, produzidas freqüentemente no ato da captura, e além desses, as serpentes apresentam grande variedade de doenças, sendo comum as infecciosas e as parasitárias, que se agravaram pelo estresse e pelos longos períodos de permanência em condições artificiais além de estarem sendo submetidos a manipulação (Melgarejo-Giménez, 2002). Portanto, após mortas, foram utilizadas para o presente estudo.

### *Preparação das amostras:*

Foram utilizadas 18 serpentes da espécie *Boa constrictor*, e 18 serpentes da espécie *Bothrops jararaca*. Todos os espécimes mortos foram imediatamente congelados até a realização da necropsia, a fim de se coletar frações do rim.

As 18 jiboias (*Boa constrictor*) encontradas atropeladas e mortas foram encaminhadas já congeladas ao Laboratório de Anatomia Animal da UVV e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a necropsia. As 18 jararacas (*Bothrops jararaca*) utilizadas, doadas pelo criador, foram trazidas vivas até o Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da UVV e lá manejadas de acordo com o as normas de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro (IBAMA, 2008). Mas alguns indivíduos foram a óbito por má adaptação ao cativeiro e portanto utilizadas para a esse estudo de análise de elementos traços.

Após a realização da necropsia, os fragmentos coletados de rim, com aproximadamente 1 grama de tecido, foram armazenados individualmente em tubo de microtitulação tipo *Eppendorf*® a  $-80^{\circ}\text{C}$  devidamente identificados. Para a digestão de todos os tecidos, foram preparadas soluções contendo 5 ml de ácido nítrico suprapuro 5 M (Merck) e 5 ml de ácido clorídrico 5 M (Merck) (Perez-Lopez, 2008 – adaptado).

Esses processos foram preparados em tubos digestores previamente lavados com solução de ácido nítrico a 10% e levados ao aparelho digestor (Marconi Mod. MA 851), por aproximadamente 4 horas a uma temperatura máxima de  $180^{\circ}\text{C}$  (Burger et al., 2006 – adaptado), até que a solução estivesse límpida e translúcida. Esta solução resultante foi transferida para tubos Falcon de 15 ml após serem filtradas, e então teve o volume final completado com água ultrapura, tipo 1 (água Mili-Q).

A quantificação dos elementos traço (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) foi realizada um padrão multielementar por espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), modelo Optima 7000 da Perkin Elmer, com coeficiente de variação sempre menor que 10%, margem que é aceitável (Wylie et al., 2009 - adaptado). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os metais analisados foram expressos na Tabela 1:

**Tabela 1.** Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) de cada elemento traço analisado pelo ICO-OES ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ).

Elementos traços	Limites de detecção	Limite de quantificação
Cd	0,1579	0,52107
Co	0,2359	0,77847
Cr	0,1208	0,39864
Cu	0,1602	0,52866
Fe	0,0581	0,19173
Mn	0,0257	0,08481
Ni	0,2338	0,77154
Pb	1,118	3,6894
Zn	0,2263	0,74679

*Análises estatísticas:*

Foram realizados Testes de t-Student e de Mann-Whitney para avaliar as concentrações de elementos traço nos rins entre machos e fêmeas de *B. constrictor* com nível de significância de  $p < 0,05$ , e para observar as concentrações de elementos traços nos rins das duas diferentes espécies da região de montanha e do litoral, a mediana e as concentrações máximas e mínimas foram expressas em tabela.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram obtidas um total de 36 amostras, divididas em duas famílias de espécies diferentes de serpentes, 18 amostras de rim da Boidae: *Boa constrictor* e 18 amostras de rim da Viperidae: *Bothrops jararaca*.

Na Tabela 2 expressam-se os valores médios e medianos das concentrações dos elementos traços presentes nos rins das serpentes estudadas. As medianas das concentrações nos representantes de *B. jararaca* foram as mais altas para seis dos elementos traços analisados, sendo somente três medianas são maiores para as *B. constrictor* encontradas na região litorânea. Concentrações elevadas de Cd e Pb, que são metais não essenciais, foram encontradas nas duas espécies analisadas, com destaque para a maior concentração de Pb. Os elementos traço não se diferem significativamente entre machos e fêmeas de jiboias, exceto para o Cromo, que é um metal essencial ( $p=0,031^*$ ). Com média de 1,6595 nas concentrações de Cr nas fêmeas e 0,2896 em machos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Mediana, mínimo e máximo valores de teor de elementos traços nos rins de *Boa constrictor* encontradas atropeladas na Rodovia do sol e *Bothrops jararaca* encontradas em áreas de produção agrícola no município de Domingos Martins.

	<i>B. constrictor</i> do litoral			<i>B. jararaca</i> de montanha		
	Mediana	Mín - Máx	♂ e ♀ (P > 0,05)	Mediana	Mín - Máx	
Cd	0,0360	0 - 0,095	P = 0,058	Cd	0,1813	0,015 - 1,05
Co	0,0451	0,015 - 0,231	P = 0,328	Co	0,0815	0,015 - 0,397
Cr	0,9131	0,0527 - 12,421	P = 0,031*	Cr	1,6967	0,12 - 8,451
Cu	3,1823	1,335 - 9,264	P = 0,450	Cu	2,9018	0,87 - 16,492
Fe	106,1860	26,685 - 275,7	P = 0,505	Fe	120,3421	30,96 - 373,535
Mn	0,7739	0,225 - 1,83	P = 0,725	Mn	0,6323	0,165 - 1,963
Ni	0,6923	0,015 - 6,616	P = 0,505	Ni	0,9155	0,039 - 8,057
Pb	1,2081	0,165 - 7,894	P = 0,450	Pb	1,5023	0,225 - 5,240
Zn	1261,8396	12,773 - 28418,28	P = 0,083	Zn	28,3597	10,395 - 74,778

Todos os valores estão expressos em mg/g

Os elementos traços encontraram-se sem diferenças para machos e fêmeas de grande parte dos elementos quantificados nos rins de *B. constrictor* analisados. Embora, o número de fêmea seja maior do que jiboias macho, as

concentrações de elementos traços não se diferenciaram entre os sexos exceto para o Cr (Figura 2). Ohlendorf et al. (1988) também não encontraram uma correlação significativa entre as concentrações das serpentes Gopher (*Pituophis melanoleucus*). Campbell (2005) encontrou diferenças significativas para o selênio e mercúrio, metal não analisado no presente estudo, em serpente d'água peçonhenta, onde machos, possuíam níveis significativamente maiores do que fêmeas, no fígado e rins. Diferenças específicas de cada sexo, na acumulação de elementos traços ocorreu em um estudo controlado de laboratório com juvenis de cobras d'água (Hopkins et al., 2002). As diferenças na acumulação de metais em serpentes fêmeas e machos pode ocorrer por causa de diferenças em função do sexo na preferência alimentar, tamanho do corpo, ou a eliminação durante a reprodução (por exemplo, as serpentes fêmeas transferem os metais para seus ovos) (Burger, 1992; Hopkins et al., 2002, 2004).

O Cd é um elemento traço não essencial e pode causar graves efeitos negativos à saúde dos animais, embora répteis e mamíferos apresentem maior resistência aos seus efeitos tóxicos quando comparados a outros vertebrados (Eisler, 1985). A origem do Cd no ambiente ocorre principalmente, por fontes antropogênicas e, bioacumula em maiores concentrações, nos rins e fígado. Teores representativos deste metal foram registrados no fígado, músculo e pele (Campbell et al., 2005). No presente estudo, não foram encontradas concentrações elevadas deste elemento no rim das serpentes analisadas, o que sugere que este único tecido não pode ser um biomarcador deste metal do organismo. Burger et al. (2005) afirmam que níveis sanguíneos de Cd podem ser indicadores de exposição recente, mas o metal pode se acumular em tecidos moles e, alguns estudos afirmam que os principais órgãos-alvo para a acumulação de Cd em mamíferos e outros vertebrados, incluindo répteis, são o fígado, rim e da mucosa intestinal (Gutleb e Gutleb, 1991; Cooke e Johnson, 1996; Furness, 1996; Linder e Grillitsch, 2000; Campbell et al., 2005; Mann et al., 2006).

Campbell et al. (2005) sugerem que as concentrações de Cd acima de 0,44 µg/g no rim podem indicar uma grande exposição ambiental à esse metal e,

grande parte das espécies de serpentes estudadas na presente pesquisa, apresentaram concentrações bem abaixo do que a sugerida pelo referido autor. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Hopkins e colaboradores (2001), quando comparados aos animais controle de seus experimentos com serpentes aquáticas. O que nos permite supor que os níveis desse elemento se encontra em baixas concentrações tanto na região serrana, quanto no litoral.

O Pb é um elemento altamente tóxico que pode causar mortalidade de animais selvagens (Mateo et al., 1998). De acordo com Kalisinska et al. (2004), uma pequena quantidade de Pb no cérebro pode alterar o comportamento das aves ao ponto de colocar em perigo a sua sobrevivência e afetar o sucesso reprodutivo. Pain et al. (1995) estabeleceram faixas de concentrações de Pb em tecido hepático e renais, onde determinaram que concentrações abaixo de 2 µg/L podem ser indicativos de uma baixa exposição ao metal. Já concentrações entre 6 e 20 µg/L estão associadas a alta exposição, podendo causar efeitos clínicos. Todos esses dados ainda não foram determinados para muitos dos répteis, incluindo as serpentes. No presente trabalho, foi possível observar baixas concentrações de Pb tanto nas jiboias quanto nas jararacas, indicando que as mesmas podem não estar sofrendo com a exposição à esse metal.

Burger e colaboradores (2005) analisando tecidos de cobra d'água (*Nerodia sipedon*) não encontraram concentrações significativamente altas de Pb em tecido renal, o que difere do presente estudo. Campbell e colaboradores (2005) encontraram concentrações máximas de Pb em tecido renais de 31 µg/g em um exemplar de *Nerodia sipedon*, resultado similar a um estudo realizado por Burger et al. (2006), que encontraram concentrações mais altas em *Akistrodon piscivorous* do que em *Nerodia fasciata*. Ambos estudos detectaram concentrações consideradas letais, o que não corrobora com o presente trabalho.

Para metais essenciais, como o Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, e Zn, não se encontrou valores limites (Taggart et al., 2006), principalmente para os répteis (Hopkins, 2000). Esses metais participam de alguns processos fisiológicos nos



organismos (Carapeto, 2012). O cobalto é um elemento químico essencial, presente na vitamina B12, com utilização principal na indústria metalúrgica para produção de aços com características especiais de dureza e resistência, como catalisador na indústria química e de óleos e na forma de sais, na indústria de cerâmica, como pigmentos. Porém, quando em excesso, os efeitos tóxicos observados nas exposições a diferentes compostos de cobalto são mais pronunciados nos pulmões humanos, na forma de asma brônquica e fibrose (Alves e Rosa, 2003). No presente estudo, tanto nas jiboias quanto nas jararacas as médias das concentrações de Co encontradas foram maiores do que as relatadas por Burger et al. (2006). Já para o Cr, as médias das concentrações encontradas foram menores do que as relatadas por Burger et al. (2006); Burger et al. (2005); Campbell et al. (2005) e Hopkings (2001).

O cobre em concentrações elevadas é prejudicial à saúde, porém, em pequenas quantidades é benéfico ao organismo humano, catalisando a assimilação do ferro e seu aproveitamento na síntese da hemoglobina do sangue, facilitando a cura de anemias (Eisler, 2000). As concentrações de cobre encontradas no presente estudo estão relativamente baixas, para as duas espécies de serpentes estudadas e são menores do que as encontradas por Hopkins et al. (2001), quando avaliaram tecidos da cobra d'água (*Nerodia fasciata*). O cobre no meio ambiente é proveniente de corrosão de efluentes de estações de tratamento de esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, escoamento superficial (Pacheco, 2009).

As médias das concentrações de Fe, principalmente nas jiboias, provavelmente por virem de áreas próximas à portos de minério de ferro, foram consideravelmente menores do que as encontradas por Burger et al. (2006) quando analisaram tecidos de serpentes aquáticas não peçonhentas (*Nerodia fasciata* e *N. taxispilota*) e peçonhentas (*Akistrodon piscivorous*) que encontraram 663 e 1779 ( $\mu\text{g/g}$ ). Já para o elemento traço Mn e Ni, as médias das concentrações encontradas foram consideravelmente maiores do que as relatadas por Burger et al. (2006).

As médias das concentrações de Zn presentes em tecido renal das serpentes do presente estudo foram muito altas, semelhantes às encontradas por Perez-Lopes et al. (2008). Levengood et al. (1999) encontraram uma grande faixa de variação nas concentrações de Zn no fígado e no rim (473- 1990 µg/g) que causaram efeitos tóxicos em patos selvagens. Para aves marinhas, Perez-Lopes et al. (2008) sugerem que concentrações hepáticas acima de 200 µg/g podem ser tóxicas. No presente estudo, as concentrações de Zn nas jibóias da região litorânea foi consideravelmente maior do que nas jararacas encontradas na região serrana, o que nos permite entender que esse elemento se encontra em concentrações muito altas nessa região.

Os efeitos tóxicos de Zn atuam sobre o sistema respiratório dos animais marinhos e nos representantes do topo de cadeia. É um elemento largamente utilizado na indústria, principalmente em galvanoplastias, na forma metálica e de sais, tais como cloreto, sulfato, cianeto, etc. Pode entrar no ambiente através de processos naturais (lixiviação de rochas e solos) e antropogênicos, entre os quais se destaca a produção de ferro e aço e os efluentes domésticos (Carvalho et al., 2008). Podemos supor então que os níveis renais de Zn podem estar causando problemas clínicos nas serpentes.

As principais fontes de Pb, Zn e Cu no ambiente são, provavelmente, de origem industrial e relacionadas ao tráfego de veículos. Apesar da adição de Pb ser proibida em combustíveis em alguns países mais desenvolvidos, as emissões relacionadas a esse metal podem ser provenientes da abrasão de pneus em superfícies de estrada, desgaste das pastilhas de freio e dos pneus dos automóveis (Zechmeister et al., 2006; Carvajal et al., 2010). As proteções de aço nas rodovias, as placas de sinalização (galvanizadas, recobertas com zinco) e as peças e baterias de automóveis também são fontes de metais pesados (Sörme et al., 2002; Lough et al., 2005).

Devido à vulnerabilidade e a grande variedade de contaminantes ambientais, as serpentes tem sido usadas como indicadores ambientais, em menores escalas, em várias partes do mundo (Burger et al., 2006; Burger et al., 2005; Campbell et al., 2005; e Hopkings, 2001). Porém, no Brasil os estudos ainda

são escassos, o que dificulta a comparação entre espécies residentes e os locais de contaminação. O presente estudo é de extrema importância, pois antes nunca havia sido avaliado grau de contaminação das espécies em questão tanto na região da Grande Vitória quanto na região serrana/ES.

## **CONCLUSÃO:**

O presente estudo indica que as serpentes analisadas, que habitam as regiões da Grande Vitória e região serrana/ES apresentam elevadas concentrações de substâncias inorgânicas tóxicas, como o Zn. Nas duas espécies estudadas, apresentam concentrações consideradas tóxicas para o elemento Zn, podendo ser uma das causas das mortes desses animais. Portanto, os elementos traço essenciais, as concentrações encontradas estão de acordo com outros estudos, mas por serem essenciais ao organismo, é difícil mensurar qual concentração poderia causar efeitos realmente tóxicos para os répteis. Os resultados apresentados nos permite afirmar que as espécies de serpentes podem ser utilizadas como indicadores da qualidade ambiental.

## REFERÊNCIAS:

- Alves, A.N.L., Rosa, H.V.D., 2003 Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 39: 2-03.
- Burger, J., 1992. Trace element levels in pine snake hatchlings: Tissue and temporal differences. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:209– 213.
- Burger, J., Campbell, K.R., Murray, R., Campbell, T.S., Gaines, K.F., Jeitner, C., Shukla, T., Burke, S., Gochfeld, M., 2007. Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. *V* 377, 2-3. P 556\_563.
- Burger, J., Campbell, K.R., Campbell, T.S., Shukla, T., Jeitner, C., Gochfeld, M., 2005. The use of skin and blood as non-destructive indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Archiv Environ ContamToxicol*;49:232–8.
- Burger, J., Murray, S., Gaines, K.F., Novak, J.M., Punshon, T., Dixon, C., Gochfeld, M., 2006. Element levels in snakes in South Carolina: differences between a control site and exposed site on the Savannah River Site. *Environmental Monitoring and Assessment* 112: 35–52.
- Campbell, K.R., Campbell, T.S., Burger, J., 2005. Heavy Metal Concentrations in Northern Water Snakes (*Nerodia sipedon*) from East Fork Poplar Creek and the Little River, East Tennessee, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 239–248.
- Carapeto, C. Metais pesados. Disponível em < <http://www.antoniofonseca.com/Unidades%20Curriculares/2-Ano/Poluicao/1%20Licoes/13%20-%2014%20-%2015/METAIS.pdf> > Acesso em 15 dez 2012.
- Carvalho, M.A., Nogueira, F., 1998. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 14(4):753-763.
- Cavajal, B., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Real, C., Carballeira, A., 2010. Influence of roads and inhabited áreas on metal concentrations in terrestrial mosses. *Atmospheric environment*. 44: 3432-3441.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V., 2009. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, São Paulo. 2ed, p 540.
- Carvalho, C.E.V., Di Benedetto, A.P.M., Souza, C.M.M., Ramos, R.M.A., Rezende, C.E., 2008. Heavy metal distribution in two cetacean species from Rio de Janeiro State, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*; 88(6): 1117–1120.
- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Fish as bioindicators. *Bioindicators and biomonitoring. Trace Metals and other Contaminants in the Environment*; 6, p 639-676.

Cooke, J.A., Johnson, M.S., 1996. Cadmium in small mammals. In: Beyer, W.N., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (Eds.), Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p 377–388.

Eisler, R., 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates. A synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report. Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, Maryland. Contaminant Hazard Reviews Report 2 ; Biological Report 85(1.2).

Eisler, R., 2000. Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Vol. 1. Metals. 738 pp. Lewis Publishers. Boca Raton. Chapter 3: Copper. p 93-200.

Gimeno\_Garcia, E., Abreu, V., Boluda, R., 1996. Heavy metals incidence in the applications of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soil. Environmental Pollution, Kidlington; 92: 1, p19-25.

Gutleb, A.C., Gutleb, B., 1991. Ruckstande von cadmium in wirbeltieren aus dem Koflachtal/Karnten. Carinthia II; 181:101, p 609–616.

Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., Giasson, L.O.M., 2003. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sueste do Brasil. Phyllomedusa 2(1); 35-41.

Hopkins, W.A., 2000. Reptile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. Environ Toxicol Chem 19: p 2391–2393.

Hopkins, W.A., Roe, J.H., Snodgrass, J.W., Jackson, B.P., Kling, D.E., Rowe, L.C., Congdon, J.D., 2001. Nondestructive indices of trace element exposure in squamate reptile. Environmental Pollution. 115, p 1-7.

Hopkins, W.A., Roe, J.H., Snodgrass, J.W., Staub, B.P., Jackson, B.P., Congdon, J.D., 2002. Effects of chronic dietary exposure to trace elements on banded water snakes (*Nerodia fasciata*). Environ Toxicol Chem 21: p 906–913.

Hopkins, W.A., Staub, B.P., Baionno, J.A., Jackson, B.P., Roe, J.H., Ford, N.B., 2004. Trophic and maternal transfer of selenium in brown house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). Ecotoxicol Environ Saf 58: p 285–293.

Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Congdon, J.D., 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snake (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. Environ Toxicol Chem. 18: p 1258–63.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?lang=&codmun=320190&search=espírito-santo|domingos-martins|infograficos:-historico>> Acesso em 27 dez 2014.

IBAMA – Instrução Normativa 169., 2008 Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes\\_normativas/IN%20n%20169%20manejo%20ex%20situ.pdf](http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/IN%20n%20169%20manejo%20ex%20situ.pdf)>. Acesso em 02 março 2015.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural.  
Disponível em:  
<[http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/caracterizacao/guarapari\\_carac.php](http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/caracterizacao/guarapari_carac.php)>  
Acesso em 22 dez 2015.

IPEMA - Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. 2004. Conservação da Mata Atlântica no Espírito Santo: Cobertura Florestal, unidades de conservação e fauna ameaçada (Programa: Centros para a Conservação da Biodiversidade Conservação Internacional do Brasil). Vitória 112p. II título.

Kiekens, L., Zinc., In: Alloway, B.J., 1990. Heavy metals in soils. Glasgow: Blackie and Son, (Ed.) p 261-177.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1998. Utilisation de Biomarqueur spourla Surveillance de la Qualite de l'Environnement. Lavoisier, Tec&Doc, Paris. (livro).

Levengood, J.M., Sanderson, G.C., Anderson, W.L., Foley, G.L., Skowron, L.M., Brown, P.W., Seets, J.W., 1999. Acute toxicity of ingested zinc shot in game-farm mallards. III. Nat. Hist. Surv. Bull. 36, 1–36.

Linder, G., Grillitsch, B., 2000. Ecotoxicology of metals. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Eds.), Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL, p 325–459.

Lough, G.C., Chauer, J.J., Park, J.S., Shafer, S.M., Deminter, J, Weinstein, J., 2005. Emissions of metals associated with motor vehicle roadway. Environmental Chemistry and Technology, 39: 826-836.

Loumbourdis, N.S., 1997. Heavy metal concentration in a lizard, *Agama stelliostellio*, compared in urban, high altitude and agricultural, low altitude areas of north Greece. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 58: 945-952. (<http://link.springer.com/article/10.1007/s001289900426#page-1>).

Mann, R.M., Matos, P., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2005. Foundation studies for cadmium accumulation studies in terrestrial isopods – diet selection and diet contamination. Eur. J. Soil Biol. 41, 153–161.

Mann, R.M., Serra, E.A., Soares, A.M.V.M., 2006. Assimilation of cadmium in a European lacertid lizard: is trophic transfer important? Environ. Toxicol. Chem. 25, 3199–3203.

Mateo, R., Estrada, J., Paquet, J.Y., Riera, X., Domínguez, L., Guitart, R., Martíñez-Vilalta, A., 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from Ebro delta, Spain. Environ. Pollut. 104, 435–440.

Melgarejo-Giménez, A.R., 2002. Em, Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.

Ohlendorf, H.M., Hothem, R.L., Aldrich, T.W., 1988. Bioaccumulation of selenium by snakes and frogs in the San Joaquin Valley, California. Copeia:704–710.

Oliveira, T.S., Costa, L.M., Cruz, C.D., Horn, H.A., 1999. Metais pesados como indicadores de materiais de origem em uma topolitosequência do triângulo mineiro, estado de minas gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1451-1465.

Pacheco, A., 2009. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, água e em *Leucopternis lacernulata* (gavião pomba). Estudo de caso: Baía de Sepitiba, Rio de Janeiro. *Gaia Scientia*, 3 (2): 23-31.

Pain, D.J., Sears, J., Newton, I., 1995. Lead concentration in birds of prey in Britain. *Environ. Pollut.* 87, 173–180.

Perez-Lopez, M., Mendonza, M.H., Beceiro, A.L., Rodriguez, F.S., 2008. Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* (70) 154–162

PMSDM – Plano Municipal de Saúde de Domingos Martins 2013-2015. Disponível em <[http://www.domingosmartins.es.gov.br/files/PDF/Plano\\_Municipal\\_Saude\\_2014\\_2017.pdf](http://www.domingosmartins.es.gov.br/files/PDF/Plano_Municipal_Saude_2014_2017.pdf)> Acesso em 27 dez 2014.

Plano de Manejo do Parque Estadual da Pedra Azul. 2004. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. CEPEMAR.

Perez-Lopez, M., Mendonza, M.H., Beceiro, A.L., Rodriguez, F.S., 2008. Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* (70) 154–162.

Ramalho, J.F., Garcia, P., Amaral, S., Nelson, M.B.V., 2000. *Ary C>X*. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesq. agropec. bras.*[online]. vol.35, n.7, pp. 1289-1303. ISSN 1678-3921.

Scartozzoni, R.R., Molina, F.B., 2004. Comportamento alimentar de boa constrictor, *Epicrates cenchria* e *Corallus hortulanus* (Serpentes: Boidae) em cativeiro. *V6*, n.1, p. 25-31. ISSN 1517-2805.

Silvia, P., Duarte, B., Castro, N., Almeida, P.R., Caçador, I., Costa, J.L., 2015. The Lusitanian toadfish as bioindicator of estuarine sediment metal burden: The influence of gender and reproductive metabolism. *Ecological Indicators*; 48, p 370-379.

Sörme, L., Lagerkvist, R., 2002. Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *Science of the Total Environment*, 298: 131-145.

Spellerberg, I.F., 1998. Ecological effects of roads and traffic: a literature review *Global Ecology and Biogeography Letters*. 7 (3) 17-333.

Taggart, M.A., Figuerola, J., Green, A.J., Mateo, R., Deacon, C., Osborn, D., Meharg, A.A., 2006. After the Aznalcoíllar mine spill: arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of Five waterfowl species. *Environ. Res.* 100, 349–361.

Tiller, K.G., 1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. In: Tiller, K.G., *Advances in soil science*. New York : Springer. 9, p 113-114.



Wanielista, P.M., Yousef, A.Y., 1993. Receiving water quality. In: *Stormwater management*. New York: Publications John Wiley, p. 159-211.

Wylie, G.G.D., Hothem, R.L., Bergen, D.R., Martin, L.L., Taylor, R.J., Brussee, B.E., 2009. Metals and Trace Elements in Giant Garter Snakes (*Thamnophis gigas*) from the Sacramento Valley, California, USA. *Arch Environmental Contamination Toxicology* 56:577–587.

Zechmeister, H.G., Hagendorfer, H., Hohenwallner, D., Hanus-Ilmar, A., Riss, A., 2006. Analyses of platinum group elements in mosses as indicators of road traffic emissions in Austria. *Atmospheric Environment* 40, 7720e7732.

CAPÍTULOS

Capítulo 2:

**EFEITOS DA DIETA COM CÁDMIO NA GENOTOXICIDADE,  
DESEMPENHO LOCOMOTOR E BIOACUMULAÇÃO DE *Bothrops jararaca*  
(SQUAMATA: VIPERIADAE)**

## RESUMO

FROSSARD, Alexandra. Universidade Vila Velha – UVV- Fevereiro de 2015.  
**Efeitos da dieta com Cádmio na genotoxicidade, desempenho locomotor e bioacumulação de *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperiadae).** Orientador: João Luiz Rossi Júnior; Co-orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Elementos traço como o Cádmio, originados pelas atividades industriais, urbanas e agrícolas estão entre os principais contaminantes ambientais que podem causar vários problemas à saúde dos ecossistemas quando ligados à cadeia trófica, afetando a dinâmica de populações selvagens e também estão essencialmente associados a problemas de desenvolvimentos fisiológicos e comportamentais. Por isso, presente estudo visou caracterizar a exposição do Cádmio *Bothrops jararaca* e avaliar os seus efeitos. Para isso, foram analisados fragmentos de rim, fígado, coração, gordura, vesícula biliar, glândula de peçonha e sangue de espécimes necropsiados pós exposição. As serpentes estudadas foram provenientes Criador Comercial de Serpentes Nikel, que fez o encaminhamento dos animais, mediante autorização do IBAMA-ES. Foram utilizadas 20 *Bothrops jararaca* subdivididas em 4 grupos com 5 animais em diferentes tratamentos por níveis de exposição. A quantificação Cd foi realizada por espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). As serpentes tiveram danos genotóxicos consideráveis e o tecido que mais bioacumulou foi o fígado seguido do rim, porém não obtiveram alterações no desempenho locomotor, quando expostos ao Cd. Resultados estes mostram que esses animais servem como bioindicadores ambientais.

**Palavras-chave:** Serpente, Contaminação, transferência trófica

## ABSTRACT

FROSSARD, Alexandra. University Vila Velha - UVV- February 2015. **Diet effects of Cadmium on genotoxicity, fitness and bioaccumulation of *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperiadae)**. Advisor: João Luiz Rossi Jr; Co-advisor: Levy de Carvalho Gomes.

Trace elements such as cadmium, originating from industrial, urban and agricultural activities are among the main environmental contaminants that can cause numerous problems for the health of ecosystems when linked to the food chain, affecting the dynamics of wild populations and are also mainly associated with developmental problems physiological and behavioral. Therefore, this study aimed to characterize the exposure of cadmium *Bothrops jararaca* and assess their effects. For this purpose, fragments were analyzed kidney, liver, heart, fat, gallbladder, and the gland blood specimens necropsied post-exposure. The snakes were studied from Commercial Creator Snakes Nickel, who made the referral of animals by the IBAMA-ES. 20 *Bothrops jararaca* were used divided into 4 groups of 5 animals in the different treatments upon exposure levels. Quantification was performed by Cd optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). Snakes had considerable genotoxic damage and the tissue that was more bioaccumulated the liver followed by kidney, but no changes in fitness obtained when exposed to Cd. These results show that these animals serve as environmental biomarkers.

**Keywords:** Snake, contamination, trophic transfer

## INTRODUÇÃO

Alguns elementos traços são considerados essenciais, pois contribuem positivamente para agricultura e à saúde humana, quando em baixas concentrações, enquanto outros, a exemplo do Cádmio (Cd), não são essenciais e são considerados tóxicos em qualquer concentração. O fator mais importante que distingue o Cádmio de outros poluentes é que ele não é biodegradável, e uma vez no meio ambiente, seu potencial de toxicidade é alto (Miranda, 1993; Robards e Woursfold, 1991).

O aumento das concentrações dos elementos traços no ambiente pode ocorrer por processos naturais ou por atividades antropogênicas (Amin et al., 2013). As fontes de origem antrópica do Cd devem-se principalmente ao uso industrial, por ter baixo ponto de fusão (320,9°C), sendo utilizado principalmente na fabricação de ligas metálicas com baixo ponto de fusão, baixo coeficiente de fricção e alta resistência à fadiga. É ainda utilizado na galvanoplastia, construção de baterias, juntamente com o Níquel, como estabilizador na indústria de plásticos polivinílicos e como pigmento amarelo em tintas e vidros (Volesky, 1990). Outras fontes de contaminação por Cádmio podem ser relacionadas às construções, ao tráfego de veículos (Davis et al., 2001; Sansalone e Buchberger, 1997) e às águas de drenagem urbana (Lee e Bang, 1999; Prestes et al., 2006). Em estudos realizados com material particulado e solo em regiões de atividade industrial intensa altos níveis de Zn, Cu, Cd e Pb são encontrados indicando que fontes antropogênicas prevalecem sobre as fontes naturais (Venditti et al., 2000).

Elementos traços como o Cádmio, originados pelas atividades industriais, urbanas e agrícolas estão entre os principais contaminantes ambientais que podem causar vários problemas à saúde dos ecossistemas quando ligados à cadeia trófica, afetando a dinâmica de populações selvagens e também estão essencialmente associados a problemas de desenvolvimentos fisiológicos e comportamentais (Frossard et al., 2013). Eles competem com minerais essenciais, como Selênio e Cálcio, nos processos metabólicos, afetando o aproveitamento destes nutrientes, impossibilitando a ocorrência de reações

químicas importantes e causando transtornos graves (Furness, 1996). O Cd quando introduzido no organismo via oral, é pouco absorvido, sendo que 95% é eliminado (Gerhardsson e Skerfving, 1996), porém, o restante é acumulado nos rins e fígado, onde foi detectado que sua meia vida biológica é de 10 anos (Tavares e Carvalho, 1992), o que classifica este contaminante como de caráter cumulativo na cadeia trófica (Miranda, 1996).

Por isso, os organismos que bioacumulam substâncias podem ser explorados como monitor de contaminação ambiental pelo fato de nos darem a resposta de quanto uma substância tóxica pode vir a atingir um tecido alvo. A relação entre essa quantidade bioacumulada no tecido e a concentração no ambiente externo é controlada por fenômenos de bioacumulação.

Algumas espécies de serpentes (Connell, 1990; Gobas e Morrison, 2000; Burger et al., 2007), começaram a ser avaliadas como boas bioindicadoras, devido os contaminantes que são conservados quando passam de um organismo para outro, dentro da cadeia alimentar, possivelmente resultando em concentrações progressivamente maiores em altos níveis tróficos, a exemplo de algumas espécies de serpentes, porém ainda carecem de estudos (Hopkins et al., 2001).

Os indicadores biológicos “ideais”, além de serem espécies sensíveis e tolerantes a perturbações, devem possuir as seguintes características: apresentar distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; preferencialmente possuir tamanho grande; apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida; ter possibilidade de uso em estudos em laboratório (Buss et al., 2003).

Algumas análises que são usadas como ferramentas para averiguar a toxicidade dos contaminantes e as respostas adaptativas a estressores nos bioindicadores, são denominadas de biomarcadores (Amorim, 2003; Buss et al., 2003; Zagotto e Bertoletti, 2006). Estes podem ser evidenciados como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais. Exemplos são os testes genotóxicos: micronúcleo e ensaio cometa (Hansen, 2003; Ramsdorf, 2007).

O teste do micronúcleo permite analisar danos no DNA, que ocorre durante o processo de mitose em células dos eritrócitos, quando os organismos são expostos a contaminantes (Ramsdorf, 2007; Ferraro, 2009). O ensaio cometa detecta danos no DNA, que são causados por alguns agentes tóxicos, tem aplicabilidade em todo organismo e tipo de célula eucariótica, é um teste barato, e é considerado adequado para o monitoramento ambiental (Tice et al., 2000). Esta técnica pode avaliar também o reparo do DNA. O cometa é formado da fragmentação do material genético que está fora do núcleo, os fragmentos são obtidos a partir da passagem de corrente elétrica (Silva et al., 2000).

Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do Cádmio em *Bothrops jararaca*, por meio de análises genotóxicas (ensaio cometa e teste do micronúcleo), assim como a quantificação do metal no organismo e então propor a hipótese de que a exposição de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* ao Cd provoca a bioacumulação desse metal, provoca alterações genotóxicas, e altera o desempenho locomotor, podendo então utilizá-las como bioindicadora ambiental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Aquisição:*

As serpentes da espécie *Bothrops jararaca* estudadas, foram doadas pelo Criadouro Comercial de Serpentes Nickel, situado em Melgaço, Distrito de Domingos Martins, Estado do Espírito Santo, Brasil. O transporte dos animais foi feito em caixas fechadas e ventiladas, e encaminhadas até o Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário Prof. Dr. Ricardo Alexandre Hippler, da Universidade Vila Velha (UVV-ES), em junho de 2013, local onde foram manejadas de acordo com as normas de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro (IBAMA, 2008). Elas foram aclimatadas com dieta ofertada inicialmente *ad libitum* para a posterior aclimação com alimento preparado. O transporte, manejo, manutenção em cativeiro e experimentos seguem as autorizações: IBAMA: Número de autorização 002/14-NUFAU/DITEC/IBAMA/ES e CEUA- UVV: Parecer Nº 283/2013).

### *Aclimação e desenho experimental:*

A aclimação aconteceu durante 10 meses com serpentes separadas em caixas plásticas individuais, contendo substrato de papelão e uma vasilha com água que eram trocadas semanalmente. Após aclimação, os animais foram alimentados quinzenalmente de forma forçada, com embutidos à base de ratos descongelados, preparados com Cádmiio e os animais do grupo controle, com embutidos sem o elemento traço. Para a inserção dos embutidos nas serpentes foi utilizada uma pinça Nicola de 18,5 cm, que era previamente lubrificada com azeite de oliva extra virgem, juntamente com o embutido. Antes de conduzir o alimento até o estômago da serpente, permitia-se que o animal mordesse e inoculasse peçonha no embutido, podendo ser visualizados nas imagens da figura 1.

Os 20 indivíduos de *Bothrops jararaca* foram aleatoriamente separados em quatro diferentes formas de contaminação induzida a cada 15 dias de acordo com o Melgarejo-Giménez, 2002 - adaptado. O primeiro grupo experimental,

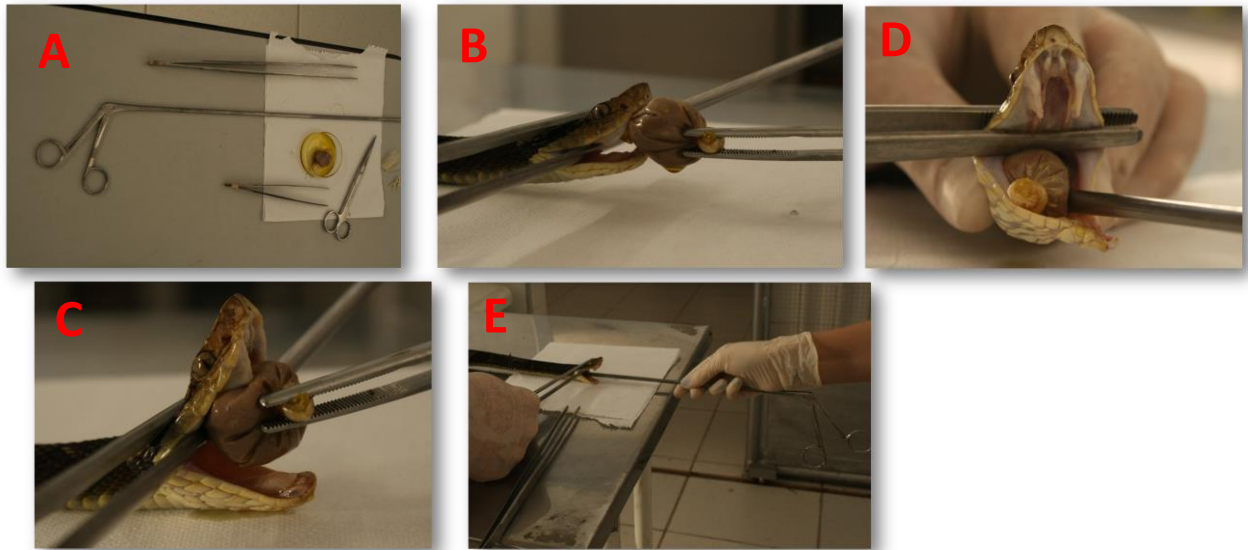


com n=5 indivíduos considerados controle, os quais foram alimentados com 3 embutidos quinzenais, sem o metal, durante o tempo de aclimatação. O segundo grupo, com n=5, as serpentes receberam uma alimentação controle, no início do experimento, e após 15 dias as serpentes receberam a segunda alimentação, já com embutidos preparados com cádmio. No terceiro grupo, com n=5, segue a mesma sequência de alimentação, com o acréscimo de outra alimentação após 30 dias, com embutidos também preparados com Cd. No quarto grupo, com n=5, segue a mesma sequência de alimentação dos grupos anteriores, totalizando 3 alimentações, com a última, ofertada com 45 dias (TABELA 1).

**Tabela 1.** Demonstração por dias dos 4 tratamentos.

<i>20 Bothrops jararaca</i>			
Controle	Trat 1 - Cd	Trat 2 - Cd	Trat 3 - Cd
Aclimatação	15 dias	30 dias	45 dias
5 indivíduos	5 indivíduos	5 indivíduos	5 indivíduos
10 embutidos sem Cd	1 embutido	2 embutidos	3 embutidos

Estes foram mantidos nestas condições até o estágio 15 dias após receber a última alimentação de cada grupo experimental. Os indivíduos foram observados todos os dias, para detectar mortalidade troca de água quando necessário e recolhimento de fezes para análises. Após esse período os animais passaram pelos testes de desempenho locomotor e então eutanasiados por meio de injeção intratecal de lidocaína 2%, sendo necropsiados em seguida.



**Figura 1:** Imagens de *B. jararaca* sendo alimentada com embutidos a base de rato triturado. A – pinça e embutido que foram utilizados; B – Abertura da cavidade oral da serpente por meio de pinça; C – Inoculação de peçonha no embutido; D – Introdução do embutido na cavidade oral da serpente; E – Embutido sendo conduzido por meio de pinça até o seu estômago da serpente.

*Preparo da alimentação:*

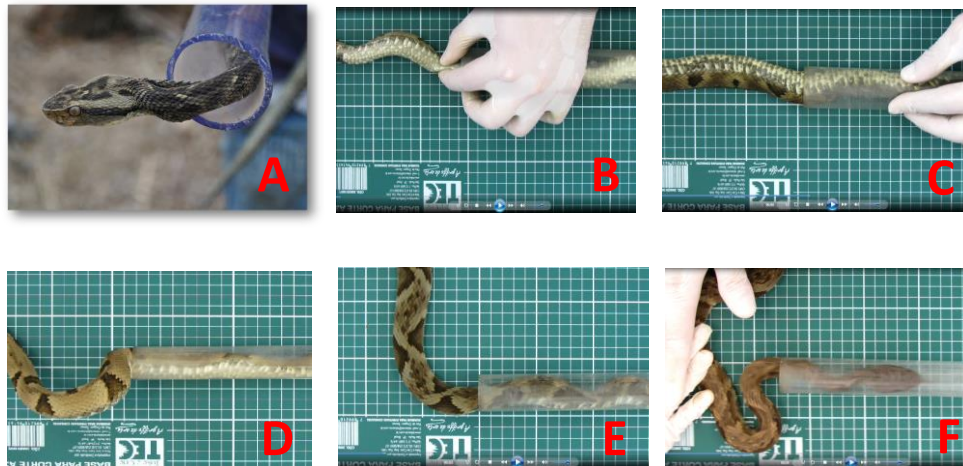
A dieta das serpentes controle foi baseada em ratos da linhagem Wistar que após eutanásia por narcose em câmara com  $\text{CO}_2$ , foram triturados e embutidos em tripa de celulose, utilizada para produção de embutidos de carne para consumo humano (Love e Love, 2005). Todos os embutidos foram preparados individualmente com 8% do peso de cada serpente.

Os animais que receberam a dieta contaminada com Cloreto de Cádmio foram alimentados com uma concentração nominal de Cd 600mg/kg de embutidos de rato, sendo utilizados 1,45 g de  $\text{Cd Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dissolvidos em 100 mL de água deionizada (Frossard et al., 2013 – adaptado). A solução foi gradualmente pulverizada sobre 1 kg do triturado de rato e posteriormente homogeneizada para garantir uma mistura uniforme do alimento. Após a homogeneização, a massa de rato triturado foi inserida na tripa a base de celulose. Todos os embutidos também foram preparados individualmente com 8% do peso de cada serpente.

Os embutidos contaminados com Cd, e os embutidos controle, sem o contaminante, foram armazenados separadamente por cada serpente, em recipientes herméticos a -20° C para evitar a peroxidação. A dieta dos indivíduos controle foi manipulada de forma similar, exceto pela adição de Cd. Foram feitos mais três embutidos a mais, para cada indivíduo, para caso ocorressem regurgitações. Quando ocorriam as regurgitações, normalmente ocorria no mesmo dia ou no máximo no dia seguinte, os embutidos regurgitados eram recolhidos do local e descartados. O substrato era trocado, e a serpente era novamente alimentada, e para isso contava-se como o tempo zero, sendo então esperado mais 15 dias para a próxima alimentação.

*Medidas de desempenho locomotor:*

Foram realizadas medidas componentes na capacidade de se endireitar das serpentes, com adaptações aos testes feitos por Delmas et al. (2007) e Frossard et al. (2013). Foi observado o tempo de endireitamento, definido como o tempo em que a serpente levava para se desvirar por completo, quando colocadas em decúbito dorsal. Esse ensaio locomotor foi realizado após 15 dias do final de cada experimento, com os animais colocados dentro de tubos de acrílico transparente para contenção de serpentes, com diâmetros variados, de acordo com o tamanho de cada jararaca (espessura e comprimento do corpo). Antes do início dos ensaios, as serpentes foram mantidas em temperatura variando entre 25 e 25,5° C. Cada jararaca foi filmada individualmente e testada por três vezes, utilizando-se uma câmera Canon HS-60, mantida em uma plataforma estática para macro fotografia. Os dois ensaios foram replicados por estado nutricional, controle, tratamento 1, tratamento 2 e tratamento 3. Os ensaios foram filmados e o registro em vídeo teve início quando as serpentes estavam posicionadas completamente em decúbito dorsal e interrompido após o completo retorno do animal à sua posição natural (posição de estação em decúbito ventral) expostos na figura 2.



**Figura 2:** A- Animal dentro do tubo de contenção; B- Serpente sendo colocada de decúbito dorsal; C- Serpente sendo filmada durante os testes de desempenho locomotor; D- Serpente ainda em filmagem, retornando ao decúbito ventral; E- Após total posicionamento natural, e término de filmagem; F- Serpente sendo contida novamente, dando-se o fim do experimento de desempenho locomotor.

### *Análises genotóxicas.*

A coleta de sangue foi realizada ao término do período experimental. Os indivíduos foram contidos fisicamente para a posterior coleta realizada por punção da veia caudal, por meio de seringa de 1, 0mL e agulha 25x7 heparinizada logo após os testes de desempenho locomotor. O sangue coletado foi utilizado nas técnicas do Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. Após coleta do sangue, os animais foram eutanasiados com injeção de lidocaína 2%, via intratecal, e o rim, fígado, vesícula biliar, gordura, músculo, sangue e coração foram retirados para realização das análises de níveis de Cd em cada amostra.

### *Ensaio cometa*

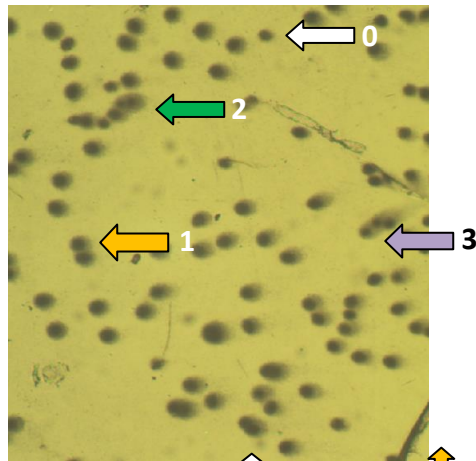
A análise de fragmentos de DNA foi realizada por meio do ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata, metodologia de Silva et al. (2000) e Tice et al. (2000).

O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso, lâminas de microscopia, duas para cada serpente, foram previamente cobertas com agarose 1,5%. As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente 10 $\mu$ L do sangue diluído

foi misturado com 100µL de agarose *low melting* a 37° C. Em seguida as lâminas com pré-cobertura de gel foram recobertas com lamínulas para que estes espalhassem uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os *slides* foram colocados na solução de lise e no momento do uso foi adicionado 1% de Triton X-100 e 10% DMSO por no mínimo 1h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético por 20 minutos. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 minutos. Depois desta etapa, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris durante 5 minutos por três vezes e então foram lavadas duas vezes com água destilada.

As lâminas foram secas por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período foram fixadas em solução fixadora por 10 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por três vezes e secas por 24 h em temperatura ambiente. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 minutos e coradas com solução de coloração com prata por 15 minutos a 37° C ou até a solução começar a escurecer. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes e então submersas por 5 minutos em solução *stop*. Passado os 5 minutos de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

A observação dos cometas foi feita com auxílio de microscópio ótico da marca LEICA GALEN III com aumento de 40X. Foram contadas 100 células de cada lâmina e os cometas foram classificados conforme forma e tamanho da cauda de 0 (não danificado) a 4 (dano máximo) demonstrados na figura 3. O tamanho da cauda foi proporcional ao nível de fragmentos de DNA.

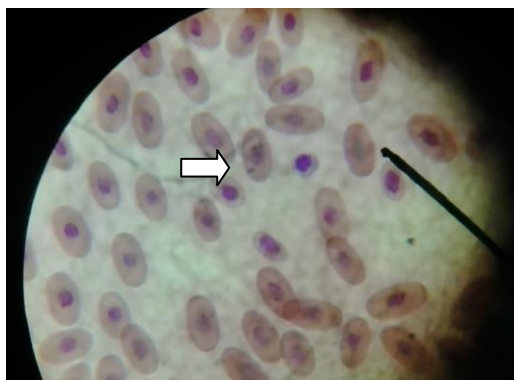


**Figura 3:** Danos ao DNA das serpentes (↑ - dano zero; ↑ - dano 1; ↑ - dano 2; ↑ - dano 3)

Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e distribuição das classes. O índice de Danos (ID) foi calculado pela multiplicação do número de nucleóides encontrados por classe pelo número da classe.

*Teste do micronúcleo:*

O teste do micronúcleo foi feito por extensões sanguíneas em lâminas segundo Grisolia et al. (2005); Bucker et al. (2006). Após secas, as lâminas foram fixadas por 30 minutos em álcool metílico P. A. (Metanol - 100%). Em seguida coradas com solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavadas posteriormente com água destilada e seca em temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico, e 1000 células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas para a quantificação dos micronúcleos presentes (FIGURA 4). Foram contadas 2 lâminas para cada serpente.



**Figura 4:** Lâmina de células contendo um micronúcleo em destaque.

### *Bioconcentração de Cádmio:*

A bioconcentração do Cádmio foi realizada segundo Burger et al. (2007), porém com as devidas adaptações para o presente trabalho. Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados e necropsiados a fim de retirar o rim, fígado, vesícula biliar, gordura, músculo, sangue e coração.

Após a realização da necropsia, os fragmentos coletados, com aproximadamente 1 grama de cada tecido (rim, fígado, coração, vesícula, gordura, glândula de peçonha e sangue) foram armazenados individualmente em tubo de microtitulação tipo *Eppendorf*® a -80°C devidamente identificados. Para a digestão de todos os tecidos, foram preparadas soluções contendo 5 ml de ácido nítrico suprapuro 5 M (Merck) e 5 ml de ácido clorídrico 5 M (Merck) (Perez-Lopez, 2008 – adaptado).

Esses processos foram preparados em tubos digestores previamente lavados com solução de ácido nítrico a 10% e levados ao aparelho digestor (Marconi Mod. MA 851), por aproximadamente 4 horas a uma temperatura máxima de 180 ° C (Burger et al., 2007 – adaptado), até que a solução estivesse límpida e translúcida. Esta solução resultante foi transferida para tubos Falcon de 15 ml e teve o volume final completado com água ultra-pura, tipo 1 (água Mili-Q) (FIGURA 5).



**Figura 5:** Imagens demonstrativas de: A – necropsia e recolhimento de amostras armazenadas em recipientes separados; B – processo de digestão no digestor; C – amostras sendo colocadas em balão volumétrico para obtenção de volume final antes da filtração.

A quantificação do Cádmiio foi realizada um padrão multielementar por espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), modelo Optima 7000 da Perkin Elmer (FIGURA 6), com coeficiente de variação sempre menor que 10%, margem que é aceitável (Wylie et al, 2009 - adaptado). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o Cd foi: 0,1579 LD e 0,52107LQ.



**Figura 6:** Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) com curva, onde as amostras foram analisadas.

### *Análise Estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0. Os resultados obtidos com as análises de ensaio cometa (índice de danos), teste micronúcleo e bioacumulação foram avaliados com teste de variância ANOVA, One Way Anova, pelo teste de Kruskal-Walis (Método de Dunn's) ( $p < 0,05$ ).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### *Tempo de endireitamento no desempenho locomotor*

A capacidade de endireitamento medido de acordo com o modelo estatístico não foi significativa para nenhum dos tratamentos T1, T2 e T3 quando comparados com o tempo de endireitamento dos animais Controle ( $p = 0,693$ ) expressos na TABELA 2.

**Tabela 2:** Tempo de virada como teste de *performance* locomotora expressos com a média, em segundos (s), das serpentes *B. jararaca*, comparando os diferentes dias de alimentação com linguças controle e contaminadas com cádmio.

	MÉDIA (s)		EP
Cont	2	±	0,31623
T1	2,4	±	0,67823
T2	2,8	±	0,73485
T3	3	±	0,70711
	f = 0,492		p = 0,693

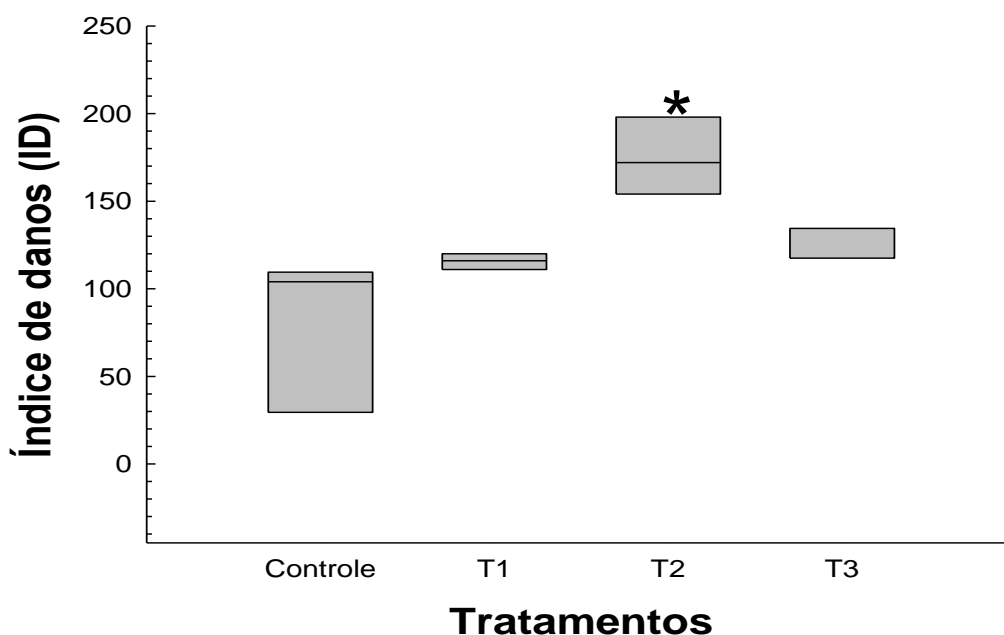
Embora a exposição a contaminantes como elementos traços e pesticidas não pode resultar diretamente em morte, as reduções no desempenho poderia vir a ser de igual importância para a aptidão dos répteis, alterando a capacidade do indivíduo para evitar predadores, captura de presas, e ou defender território. DuRant et al., (2007) examinaram os efeitos do carbaril, um defensivo agrícola de inibição de acetilcolinesterase, sobre o desempenho locomotor em lagartos (*Sceloporus occidentalis*) e verificaram que o produto químico diminui consideravelmente o desempenho dos lagartos. Outros dois estudos sobre os efeitos do carbaril na velocidade de natação em duas espécies de serpente d'água (*Seminatrix pygaea* e *Nerodia rhombifer*) observou a diminuição no desempenho de natação durante as primeiras 24 h após a exposição, mas os animais se recuperam dentro 96 h após a exposição (Hopkins et al., 2005; Hopkins e Winne, 2006). A exposição a carbaril também resultou num decréscimo na velocidade de natação em girinos da rã-leopardo (*Rana blairi*) (Bridges, 1997). O teste de desempenho locomotor foi analisado também por

Delmas et al (2007) para os quelônios *Trachemys scripta elegans*, no qual observaram que sexo, identidade materna, taxa de crescimento juvenil e estado nutricional influencia o desempenho desses animais, uma vez que fêmeas com maior taxa de crescimento, juvenis recém alimentados e machos com menor taxa de crescimento apresentaram maior estado de latência. Frossard et al. (2013) testaram o Cádmio em quelônios (*Podocnemis unifilis*) e encontram diferença significativa apenas para os primeiros 30 dias de exposição ao Cd, o que não ocorreu com as *B. jararaca*, mostrando que o tempo de exposição ou o nível de contaminação não foi suficiente para uma possível resposta postural como índice de aptidão relacionado ao elemento traço, pois as médias mostram o início de um possível atraso postural, mas, que não foram significativamente diferentes.

### *Análises genotóxicas*

#### *Ensaio cometa*

A exposição das serpentes ao cádmio em diferentes tempos e número de alimentações (T1=15 dias com 1 alimentação; T2=30 dias com duas alimentações ; T3=45 dias com 3 alimentações e Cont=Controle) provocou aumento significativo no índice de danos no DNA dos eritrócitos quando comparados ao grupo controle (Figura 7). No entanto, foram observadas apenas diferenças significativas entre os tratamentos (Cont e T2).



**Figura 7.** Índices de danos no DNA (ID) nos eritrócitos de *Bothrops jararaca*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=15 dias; T2=30 dias; T3=45 dias e Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana. Asterisco indica diferença significativa do controle aos demais tratamentos, por meio do teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Miyamoto et al. (2005) e Bronikowski (2008) observaram a presença de supraorganização de cromatina, fragmentação do DNA, morte celular, micronúcleos e cometas em quatro espécies de serpentes (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, e *Bothrops neuwiedii*) e Schaumburg et al. (2012) para lagartos (*Tupinambis meriane*) hoje chamado *Salvator merianae* (SBH, 2014), naturalmente em animais de vida livre, o que corrobora com a ocorrência de baixo mais existente, índice de danos, nas *B. jararaca* do grupo controle concordando com os números naturais basais .

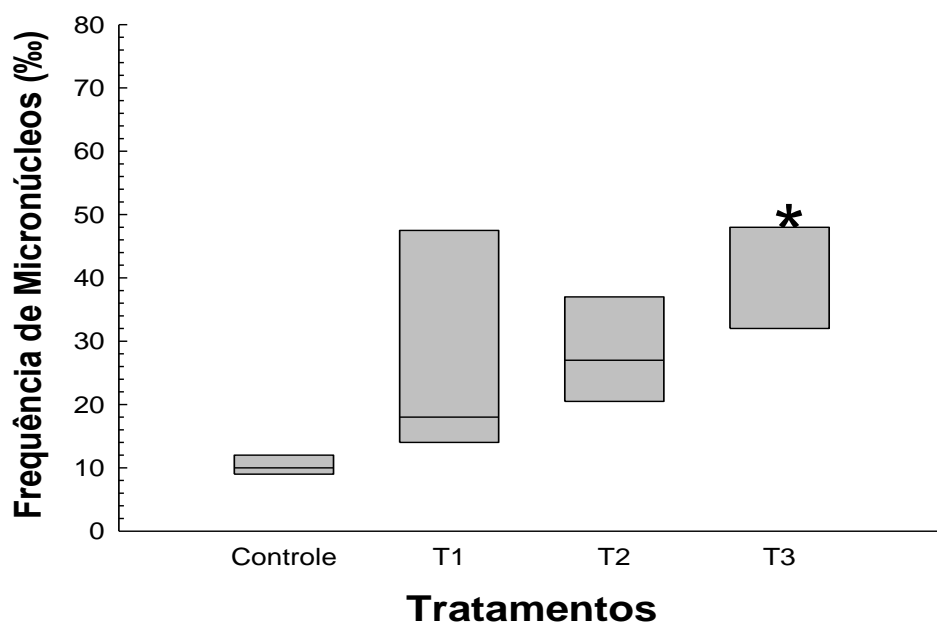
Já o aumento na indução de danos no DNA observado nas serpentes *Bothrops jararaca* provocado pela exposição ao Cádmiu corrobora com os demais trabalhos que afirmam que os elementos traços e alguns defensivos agrícolas causam efeitos deletérios em células somáticas ou germinativas (Dhawan et al., 2009). Esta indução de danos no DNA (índice e frequências de danos) também foi observada em girinos da espécie *Hypsiboas faber* coletados em área de mineração de carvão quando comparados com animais de referência

(Zocche et al., 2013). Os autores desse estudo relataram que os resíduos de mineração de carvão também causam alterações genotóxicas em anfíbios, além de provocarem efeitos adversos no solo, água, vegetação e animais.

Em virtude das serpentes serem importantes predadores de pequenos mamíferos que vivem em áreas agrícolas, proximidades de rodovias e áreas urbanas com áreas verdes, entram em contato direto com defensivos agrícolas e outros poluentes, sendo que em muitos destes possuem em sua composição química a presença de metais, como o Cádmiio. Em estudos com defensivos agrícolas, Feng et al. (2004) observaram aumento nos danos no DNA dos eritrócitos de rã (*Rana n. hallowell*) nas concentrações de 0,05 - 0,5 mg l<sup>-1</sup> para Imidacloprid®, e de 5 - 100 mg l<sup>-1</sup> para RH-5849, em sete dias de exposição. Segundo os autores mesmo em dosagens pequenas do defensivo Imidacloprid® causa danos no DNA das rãs.

#### *Teste do micronúcleo*

A exposição das serpentes de *B. jararaca* ao cádmio provocou aumento significativo na frequência de células eritrocitárias com presença de micronúcleo, sendo essa frequência com diferenças significativas, apenas entre controle e T 3 (p=0.014) expressas na figura 8.



**Figura 8.** Frequência média de eritrócitos micronucleados em *Bothrops jararaca*, expostas ao cádmio nos seguintes tratamentos: T1=15 dias; T2=30 dias; T3=45 dias; Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana. Asterisco indica diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Mediante a esse incremento significativo de micronúcleo, pode-se dizer que as substâncias testadas no presente trabalho causam quebras no cromossomo ou provocam uma disfunção do aparelho do fuso mitótico durante a divisão celular (Winter et al., 2007). E como consequência desse dano, o organismo pode desenvolver tumores e ter problemas reprodutivos (Moreira et al., 2010).

De acordo com Miyamoto et al. (2005); Bronikowski (2008); Polleta et al. (2008) e Schaumburg et al. (2012) o teste do micronúcleo demonstra ser adequado para avaliar a efeito de agentes tóxicos/genotóxicos em répteis. Outros trabalhos também mostram que a exposição de répteis a metais induzem um aumento significativo na quantidade de células eritrocitárias com presença de micronúcleo, como observado por Frossard et al. (2013) no quelônio *Podocnemis unifilis* (tracajá da Amazônia) expostos ao sulfato de cádmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ( $593,347 \pm 59,7$  mg/kg), por 30 e 60 dias horas; e por Mouchet et al. (2006) em girinos de *Xenopus laevis* expostos ao cádmio (2, 10, 30  $\mu\text{g/L}$ ), por 12 dias.

Feng et al. (2004) testando dois defensivos agrícolas em girinos de *Rana n. hallowell*, também observaram a indução na formação de micronúcleos eritrocitários, no entanto apenas em concentrações elevadas de Imidacloprid® (8 mg/l<sup>-1</sup> e 32 mg l<sup>-1</sup>) e RH-5849 (40 mg l<sup>-1</sup>). Segundo os autores a exposição de sete dias é suficiente para observar a presença de micronúcleos em eritrócitos de anfíbios. Mas como visto no presente estudo, na exposição de 15, 30 e 45 dias também é possível observar a presença de micronúcleo, porém observa-se que os répteis são menos sensíveis que os anfíbios.

Entre os vertebrados aquáticos e terrestres, os répteis fazem parte de um grupo pouco estudados nas avaliações genotóxicas. Tais estudos estão na fase inicial, onde alguns autores já descreveram os valores basais (Miyamoto et al., 2005; Bronikowski, 2008; Poletta et al., 2008; e Schaumburg et al., 2012) e outros vêm os inserindo nas análises ambientais, com quelônios com elementos traços (Matson et al., 2005; e Frossard et al., 2013), crocodilianos com Roundup® (Poletta et al., 2009) e lagartos com fungicida (Capriglione et al., 2011), e no presente estudo, com serpentes. Os répteis provaram ser úteis como modelos biológicos nos testes de micronúcleo e na indução de danos primários no DNA (ensaio cometa) de eritrócitos. Foi observado que tais animais respondem à situações de poluição, indicando ser sensíveis e com isso poderem ser usados como bioindicadores de contaminação do ambiente. Sendo assim, o que se observou nos resultados genotóxicos obtidos no presente trabalho é que o cádmio possui efeito tóxico sobre as *Bothrops jararacas*.

#### *Bioacumulação de Cádmio*

A análise de bioacumulação de cádmio nos tecidos (rim, fígado, coração, vesícula, gordura, glândula de peçonha e sangue) das serpentes *B. jararaca* mostra que houve um aumento na concentração desse metal no organismo dos animais expostos em relação ao controle quando em observação às medianas, porém esse aumento foi significativo apenas nos rins ( $p < 0,005$ ) quando comparados os animais controle com o Trat 3 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Bioacumulação de cádmio em *Bothriopsis jararaca*, expostos aos seguintes tratamentos: T1=15 dias com 1 alimentação; T2=30 dias com duas alimentações ; T3=45 dias com 3 alimentações e Cont=Controle. Os dados estão expressos em mediana, mínimos e máximos. Asteriscos indicam diferença significativa do controle aos demais tratamentos por teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Tecido	Controle			Trat 1			Trat 2			Trat 3			Estatística	
	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	F	P
Rim	0,2775*	0,1339	± 0,5660	1,2077	0,3053	± 1,8164	1,1500	0,6362	± 1,7689	2,3515*	0,9668	± 4,1038	6,7880	0,004*
Fígado	0,0096	0,1050	± 0,2632	3,1084	0,1200	± 8,7447	3,4678	0,0900	± 0,1596	6,7441	10,0607	± 17,8543	1,929	0,166
Coração	0,0100	0,0993	± 1,2295	0,4249	0,1490	± 0,8006	0,4013	0,1800	± 0,7992	0,8188	0,2700	± 1,4139	0,859	0,482
Vesícula	0,4084	0,1200	± 0,8940	0,3150	0,1323	± 0,4967	0,4089	0,1349	± 0,8940	0,4563	0,1350	± 0,8940	0,432	0,733
Gordura	0,6585	0,4500	± 0,9813	0,5592	0,1200	± 1,6667	0,7788	0,2250	± 1,2963	2,8697	0,1323	± 8,1776	1,842	0,18
Gld. Peçonha	0,4931	0,2581	± 0,6904	0,7050	0,2903	± 0,9653	0,7256	0,5161	± 0,9292	0,6374	0,3000	± 0,8911	1,154	0,358
Sangue	0,0242	0,3600	± 0,4049	0,4017	0,3300	± 0,4785	0,4050	0,3900	± 0,4200	0,4646	0,3450	± 0,7178	1,06	0,394

Os répteis necessitam de quantidades muito menores de alimento do que os animais vertebrados endotérmicos, e as serpentes possuem a fisiologia alimentar radicalmente diferente em termos de frequência. Esses animais passam longos períodos em jejum sem grandes complicações, até que voltem às caças de espreita ingerindo presas relativamente grandes (Nascimento e Oliveira, 2007). Por isso, a alimentação dos viperídeos ocorreu quinzenalmente, com embutidos a base de rato, previamente preparados e predados individualmente com 8% do peso de cada animal.

O presente estudo demonstra que os itens alimentares podem ser uma importante fonte de exposição de elementos traço para as serpentes, pois apesar das *B. jararacas* não terem bioacumulado Cd de forma significativa na maioria dos seus tecidos, a bioacumulação no rim mostrou-se eficiente sendo uma redistribuição do fígado para os rins, e posteriormente este pode ter redistribuído para a gordura. Em outros estudos, o Cd e outros elementos traço, quando expostos por maior tempo, bioacumulam significativamente, com a exemplo de Hopkins et al. (2001 e 2002) que alimentaram cobras d'água (*Nerodia fasciata*) com cinzas de carvão que continham níveis elevados de As, Cd, Cu, Se e Sr por um ano e quatro meses.

Embora, no presente estudo, o maior índice de bioacumulação ter ocorrido no fígado, corroborando com os experimentos de Hopkins et al (2001 e 2002), este tecido não apresentou diferenças estatísticas significativas, provavelmente pelo fato desse tecido ter redistribuído para os demais tecidos. Contudo o rim se mostra como segundo tecido que mais bioacumula, corroborando também com trabalhos realizados em condições de campo (Burger, 1992; 2006; 2007; Hopkins et al., 1999; 2001 e 2002; Campbell et al., 2005). O Cd se acumula essencialmente nos fígado e rins dos vertebrados. O fígado é conhecido como o principal órgão que acumula e redistribui Cd para outros órgãos, principalmente os rins (Zago et al., 2010).

De acordo com as descrições anatômicas e fisiológicas feitas por Azevedo-Marques et al. (2003); Nascimento e Oliveira 2007; Cardoso et al. (2009) com relação às glândulas de peçonha, essas estruturas foram analisadas por estarem diretamente ligada a alimentação das *B. jararacas*, e pelo fato de em



todas as alimentações, ter sido permitido que a peçonha fosse inoculada nos embutidos, antes da alimentação ser induzida. Foi observado que essas glândulas apresentam maiores níveis de Cd do que os observados no sangue e na vesícula biliar, o que nos faz entender que além de estarem consumindo um alimento previamente contaminado, uma segunda dose, mesmo que em menores proporções, o elemento traço encontrado nestas análises, é inoculado, junto a peçonha quando o alimento foi ofertado no momento que permitiu-se que o animal mordesse o embutido, proporcionando o aumentando dos níveis de Cd no alimento.

Diante da função fisiológica do fígado no processo de digestão, descritas por Schmidt-Nielsen (2002), foi possível entender os níveis de Cd nas vesículas biliares presentes analisadas no presente estudo. O fígado com os maiores percentuais de Cd, produziu bile, e esse líquido foi então transferido para a vesícula com menores teores, porém contendo Cd, que conseqüentemente atuou na digestão do alimento que possui gordura. Já a gordura, terceiro tecido que mais bioacumulou Cd no presente estudo, reteve o metal dos embutidos contaminados conforme descrições de Schmidt-Nielsen (2002), onde o bioacumulou em níveis consideráveis, porém não estatisticamente significativos, provavelmente pelo tempo de exposição, mas que, se as médias forem analisadas, observa-se o aumento no decorrer do tempo de exposição.

No presente estudo, também houve uma considerável bioacumulação do Cd no coração, se encontrando em níveis próximos da glândula de peçonha, porém abaixo da gordura. É comumente aceito que rins e fígado são os principais órgãos de acumulação de metais pesados (Burger, 1992; 2006; 2007; Hopkins et al, 1999; 2001 e 2002; Campbell et al, 2005). Entretanto, em estudos com outros vertebrados, os níveis desse elemento, para as aves, no coração se mostrou bastante eficiente para as análises e, em alguns casos, acumulou mais metais do que o fígado (Szkoda et al, 2011).

Nas amostras de *Bothrops jararaca*, os níveis sanguíneos geralmente tiveram as mais baixas concentrações de Cd quando comparados com os níveis em órgãos internos. Os níveis sanguíneos podem refletir relações toxicológicas complexas entre cargas corporais, entre a ingestão recente, e excreção, dados

que corroboram com os de Burger e colaboradores (2005). Embora o sangue tenha se mostrado útil para a exposição de metais em outras circunstâncias, no presente estudo não foram encontrados preditivos da carga corporal nas jararacas. Embora o uso do sangue seja um dos métodos não letais, existem também dificuldades com a coleta de sangue. Para coletar quantidades adequadas deste tecido são necessários conhecimentos anatômicos do trajeto dos vasos sanguíneos e da localização exata do coração, sem ferir a serpente. Observou-se que o sangue coletado na veia da caudal resultou em pequeno volume de amostra, porém na maioria das vezes, suficiente, para análise ecotoxicológica (Burger et al, 2005; 2006; 2007; Campbell et al, 2005; Hopkins et al, 2001, Zago et al, 2010).

Diante dos resultados expostos e discutidos, questiona-se ainda se as serpentes terrestres podem ser mais tolerantes ou não à exposição de elemento traço em níveis mais altos do que outros vertebrados, pois os níveis de Cd adicionados no alimento estavam consideravelmente altos, porém pouco bioacumulou, quando comparado a outros estudos e no tempo de exposição do presente estudo.

A sugestão foi feita do pressuposto de que muitos répteis podem ser mais sensíveis aos efeitos orgânicos de contaminantes do que outras classes de vertebrados, presumivelmente por causa da fisiologia ectotérmica, sistemas enzimáticos aparentemente primitivos, e o alto estado trófico dos répteis (Hall, 1980), o que torna difícil especular sobre a sensibilidade desses animais, quando comparados a outros vertebrados.

Para entender melhor os efeitos do Cádmio e de outros elementos traço sobre as serpentes, estudos sobre os efeitos de contaminantes precisam ser feitos também sobre pontos reprodutivos, efeitos adversos que podem ser passados para a prole, diferenças também podem vir a ser observadas nos diferentes sexos, e tamanho de cada indivíduo.

Além disso, as serpentes alimentadas com uma abundância de presas previamente congelada em condições de laboratório, não suportam os desafios fisiológicos complexos encontrados pelas serpentes em seu ambiente natural

(por exemplo, o parasitismo, periódica indisponibilidade presa, e os custos de atividade), e, portanto, só pode fornecer estimativas conservadoras de respostas biológicas para exposição de contaminantes *in situ*. Pesquisas futuras poderão dar continuidade a este estudo, avaliando a sensibilidade dos répteis ao Cd e outros contaminantes inorgânicos significativamente para a toxicologia de répteis e para os esforços de conservação.

## **CONCLUSÃO:**

O presente estudo indica que as serpentes *Bothrops jararacas*, utilizadas em experimento *in situ*, alimentadas com embutidos contaminados com Cádmiu tiveram danos genotóxicos consideráveis após a segunda e terceira alimentação, 30 e 45 dias de experimento respectivamente. Para as análises de bioacumulação o elemento traço, apresentou diferenças significativas de contaminação renal entre os animais do grupo controle e o grupo do Tratamento 3, após 45 dias, porém, as maiores concentrações do contaminante foram observadas nas análises de fígado, seguida do rim e gordura. Os resultados apresentados nos permite afirmar que a espécie pode ser utilizada como indicador da qualidade ambiental.

## REFERÊNCIAS:

- Amin, N., Hussain, A., Alamzeb, S., Begum, S., 2013. Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. *Food Chemistry* 136 (3-4) 1515-1523.
- Azevedo-Marques, M.M, Cupo, P., Hering, S.E., 2003. Serpentes peçonhentas. *Medicina, Ribeirão Preto*. 36: 480-489.
- Baird, C., 2002. *Química Ambiental*, Ed. Bookman, p.555-557.
- Bridges, C.M., 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1935–1939.
- Bronikowski, A.M., 2008. The evolution of aging phenotypes in snakes: a review and synthesis with new data. *American Aging Association*. 30:169–176.
- Bucker, A., Carvalho, W., Alves-Gomes, J.A., 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleotei: Gymnnoformes) expostos ao bezeno. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 357-364.
- Burger, J., Campbell, K.R., Murray, R., Campbell, T.S., Gaines, K.F., Jeitner, C., Shukla, T., Burke, S., Gochfeld, M., 2007. Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. 377, 2-3. p 556\_563.
- Burger, J., 1992. Trace element levels in pine snake hatchlings: Tissue and temporal differences. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:209– 213.
- Burger, J., Murray, S., Gaines, K.F., Novak, J.M., Punshon, T., Dixon, C., Gochfeld, M., 2006. Element levels in snakes in South Carolina: differences between a control site and exposed site on the Savannah River Site. *Environmental Monitoring and Assessment* 112: 35–52.
- Campbell, K.R., Campbell, T.S., Burger, J., 2005. Heavy Metal Concentrations in Northern Water Snakes (*Nerodia sipedon*) from East Fork Poplar Creek and the Little River, East Tennessee, USA. *Arch. Environ. Contam.Toxicol.* 49, 239–248.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V., 2009. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, São Paulo. 2ed, p 540.
- Connell, D.W., 1990. *Bioaccumulation of Xenobiotic Compounds*. CRC Press, Boca Raton, FL. Disponível em <[http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=XTN0P3SU754C&oi=fnd&pg=PA10&dq=Bioaccumulation+of+Xenobiotic+Compounds.&ots=0NtqWtMqVI&sig=C1IVlxtWva4ygvzZdJPbk\\_qviFU#v=onepage&q=Bioaccumulation%20of%20Xenobiotic%20Compounds.&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=XTN0P3SU754C&oi=fnd&pg=PA10&dq=Bioaccumulation+of+Xenobiotic+Compounds.&ots=0NtqWtMqVI&sig=C1IVlxtWva4ygvzZdJPbk_qviFU#v=onepage&q=Bioaccumulation%20of%20Xenobiotic%20Compounds.&f=false)> Acesso em 27 dez 2014.

Capriglione, T., Iorio, S., Gay, F., Capaldo, A., Vaccaro, M.C., Morescalchi, M.A., Laforgia, V., 2011. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*. 20:885–891.

Davis, A.P., Shokouhian, M.N.S., 2001. Loading estimates of lead, copper, cadmium and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere*, 44: 997-1009.

Delmas, V., Baudry, E., Girondot, M., Prevot-Julliard, A.C., 2007. The righting response as a fitness index in freshwater turtles. *Biological Journal of the Linnean Society London* 91, 99–109.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, v. 25, n. 1, p. 5-32.

DuRant, S.E., Hopkins, W.A., Talent, L.G., 2006. Impaired terrestrial and arboreal locomotor performance in the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) after exposure to an AChE-inhibiting pesticide. *Environmental Pollution*. 149, 18 e 24.

Frossard, A., Ferreira, P.D., Carneiro, M.T.W.D., Heringer, D.C., Endringer, O.A., Gomes, L.C., 2013. Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. *Aquatic Toxicology* 140– 141 239– 241.

Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P., 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana n. hallowell*. *Chemosphere*, v. 54, p. 457-463.

Furness, R.W., 1996. Cadmium in birds. In: *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Beyer, N.W., Heinz, G.H. and Redmon-Norwood, A.W. (eds). Lewis Publishing, Boca Raton, FL, pp. 389–404.

Gerhardsson, L., Skerfving, S., 1996. Concepts on Biological Markers and Biomonitoring for Metal Toxicity. In: CHANG, L. W. *Toxicology of Metals*. Boca Raton, Flórida: CRC Press IC, cap.06, p.81-112.

Gobas, F.A.P.C., Morrison, H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Boethling, R.S., Mackay, D. (Eds.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189±231.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and molecular biology*, v. 28, n. 2, p. 334-338.

Hall, R.J., 1980. Effects of environmental contaminants on reptiles: A review. *Special Scientific Report—Wildlife* 228. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC.

Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Congdon, J.D., 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snake (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environ Toxicol Chem*. 18:1258–63.

Hopkins, W.A., Roe, J.H., Snodgrass, J.W., Jacson, B.P., Kling, D.E., Role, C.L., Congdon, J.D., 2001. Nondestructive indices of elemento exposure in squamate reptile. *Environmental Pollution*. 155: 1-7.

Hopkins, W.A., Roe, J.H., Snodgrass, J.W., Staub, B.P., Jackson, B.P., Congdon, J.D., 2002. Effects of chronic dietary exposure to trace elements on banded water snakes (*Nerodia fasciata*) *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 5, pp. 906–913.

Hopkins, W.A., Winne, C.T., DuRant, S.E., 2005. Differential swimming performance of two natricine snakes exposed to a cholinesterase-inhibiting pesticide. *Environmental Pollution* 133, 531 e 540.

Hopkins, W.A., Staub, B.P., Baionno, J.A., Jackson, B.P., Roe, J.H., Ford, N.B., 2004. Trophic and maternal transfer of selenium in brown house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 58:285–293.

IBAMA – Instrução Normativa 169., 2008 Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes\\_normativas/IN%20n%20169%20manejo%20ex%20situ.pdf](http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/IN%20n%20169%20manejo%20ex%20situ.pdf)>. Acesso em 02 março 2015.

Lee, J.H., Bang, K.W., 1999.Characterization of urban stormwater runoff. *Water Research*, 34: 1773-1780.

Love, K., Love, B., 2005. Corn Snakes, *The Comprehensive Owner's Guide: From the experts at advanced vivarium systems. The Herpetocultural Library. Advanced Vivarium Systems. Irvine, California. p 60-64.*

Matson, C., Palatnikov, G., Islamzadeh, A., Mcdonald, T.J., Autenrieth, R.L., Donnelly, K.C., Bickham, J.W., 2005. Chromosomal Damage in Two Species of Aquatic Turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) Inhabiting Contaminated Sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology*, 14, 1–13.

Melgarejo-Giménez, A.R., 2002. Em, Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.*

Miranda, C.E.S., 1993. Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com pré-concentração em resina de troca iônica empregando sistema FIA. São Carlos, 89p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Miyamoto, M., Vidal, B.N., Mello, M.L.S., 2005. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. *Biochemistry and Cell Biology*, 2005, 83(1): 15-27, 10.1139/o04-108.

Moreira, T., Nunes, E., Leal, M., Schulz, U., Lemos, C., 2010. Influência dos Métodos de Captura de Peixes na Avaliação Genotóxica Utilizando Diferentes Tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 5(1): 1-7.

- Nascimento, L.B., Oliveira, M.E., 2007. Herpetologia no Brasil II. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte. p 354.
- Perez-Lopez, M., Mendonza, M.H., Beceiro, A.L., Rodriguez, F.S., 2008. Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* (70) 154–162.
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mundry, M.D., 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* V. 650, Issue 2, Pages 202–209.
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mundry, M.D., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. [672, 12](#), 95–102.
- Prestes, E.C., Anjos, V.E., Sodr , F.F., Grassi, M.T., 2006. Copper, lead and cadmium loads and behavior in urban stormwater runoff in Curitiba, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 17: 53-60.
- Robards, K., Woursfold, P., 1991. Cadmium: Toxicology and analysis. *Analyst*. v. 116, n.06, p. 549-568.
- Schaumburg, L.G., Poletta, G.L., Siroski, P.A., Murdy, M.D., 2012. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 84, 99–103.
- Schmidt-nielsen, K., 2002. *Fisiologia Animal Adapta o e Meio Ambiente*. Santos. S o Paulo. Ed.5.
- Silva, J., Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B., 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 241-245.
- Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2014. R pteis brasileiros: Lista de esp cies. Costa, H.C., B rnils, R.S. *Herpetologia Brasileira*. V 3, N 3.
- Szkoda, J., Nawrocka, A., Kmiecik, M.,  mudzki, J., 2011. Monitoring study of toxic elements in food of animal origin (in Polish). In *Ochrona  rodowiska i Zasob w Naturalnych*, vol. 48, p. 475-482.
- Tavares, T.M., Carvalho, F.M., 1992. Avalia o da exposi o de popula es humanas   metais pesados no ambiente: exemplos do Reconcavo Baiano. *Qu mica Nova*. v.15, n.2, p.147-54.
- Tice, R.R., Arurell, 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 vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221.



Volesky, B., 1990. Removal and Recovery of Heavy Metals by Biosorption. In: Volesky, B. Biosorption of Heavy Metals. Boca Raton, Flórida: CRC Press IC, cap.1.2, p.7-43.

Winter, M.J., Ellis, L.C.J., Hutchinson, T.H., 1994. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with YOSHIKAWA, H.; KAWAI, F.; KANAMORI, M. The relationship between the EEG and brain pH in carp, *Cyprinus carpio*, subjected to environmental hypercapnia at an anesthetic level. Comparative Biochemistry and Physiology A, v. 107, p. 307-312.

Wylie, G.G.D., Hothem, R.L., Bergen, D.R., Martin, L.L., Taylor, R.J., Brussee, B.E., 2009. Metals and Trace Elements in Giant Garter Snakes (*Thamnophis gigas*) from the Sacramento Valley, California, USA. Arch Environmental Contamination Toxicology 56:577–587.

Zago, C.E., Ferrarezi, A.L., Vizotto, L.D., Oliveira, C., Cabral, S.R., Taboga, S.R., Bonilla-Rodriguez, G.O., Venancio, L.P., Bonini-Domingos, C.R., 2010. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Genetics and Molecular Research, 9: 721-726.

Zocche, J.J., Damiani, A.P., Hainzenreder, G., Mendonça, R.A., Peres, P.B., Santos C.E.I. Debastiani R. Dias J.F. Andrade V.M. 2013. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (Anuran Amphibian) in coal open-casting mine. Environmental Toxicology and Pharmacology, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.015>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2015.