

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

BIANCA ROBERTA CATANI CHAGAS

**RESPOSTAS METABÓLICAS EM GIRINOS DE RÃ-
TOURO, *Lithobates catesbeianus* APÓS EXPOSIÇÃO AO ZINCO,
COBRE E CÁDMIO**

Sorocaba
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

BIANCA ROBERTA CATANI CHAGAS

**RESPOSTAS METABÓLICAS EM GIRINOS DE RÃ-
TOURO, *Lithobates catesbeianus* APÓS EXPOSIÇÃO AO ZINCO,
COBRE E CÁDMIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA).

Orientadora: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Sorocaba
2019

CHAGAS, BIANCA ROBERTA CATANI

RESPOSTAS METABÓLICAS EM GIRINOS DE RÃ-TOURO,
Lithobates catesbeianus APÓS EXPOSIÇÃO AO ZINCO,
COBRE E CÁDMIO / BIANCA ROBERTA CATANI
CHAGAS. -- 2019.
98 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Banca examinadora: Profa. Dra. Monica Jones Costa ; Profa.
Dra. Silvia Pierre Irazusta

Bibliografia

1. Anfíbios. 2. Metais. 3. Metabolismo energético. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

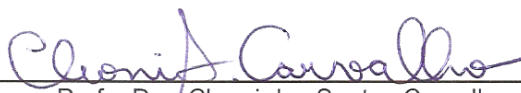


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

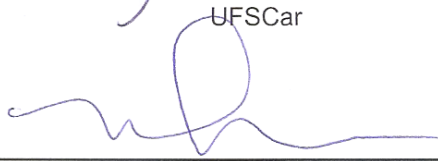
Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bianca Roberta Catani Chagas, realizada em 27/02/2019:



Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
UFSCar



Profa. Dra. Monica Jones Costa
UFSCar



Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta
CEETEPS

BIANCA ROBERTA CATANI CHAGAS

**RESPOSTAS METABÓLICAS EM GIRINOS DE RÃ-TOURO,
Lithobates catesbeianus APÓS EXPOSIÇÃO AO ZINCO, COBRE E CÁDMIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), Sorocaba, 27 de fevereiro de 2019.

Orientação: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Orientadora:

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Examinadora:

Profa. Dra. Monica Jones Costa

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Examinadora:

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – FATEC SO

SOROCABA
2019

DEDICATÓRIA

À minha família, sem eles eu não seria nada.

AGRADECIMENTO

Agradeço os meus pais por me apoiarem e me incentivarem cada vez mais e por me ensinarem a não desistir dos meus sonhos. E aos meus amigos que me deram suporte e pela paciência comigo durante os momentos de estresse.

Agradeço à Professora Dra. Cleoni dos Santos Carvalho pela orientação e por todos ensinamentos trocados durante essa fase de mestrado e principalmente por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto.

Agradeço a Técnica Ms. Heidi Samantha Moraes Utsunomiya por me ajudar com os primeiros procedimentos no laboratório.

Agradeço a disponibilidade do laboratório de Bioclima da Professora Dr. Janaina Braga, assim como agradeço ao Técnico Leonardo Dr. Leonardo Pitombo, pela ajuda com a leitura de microplacas.

Agradeço as Professoras Dra. Mônica Jones e Dra Elaine C. Mathias da Silva Zacarin por toda ajuda com o grupo de pesquisa e com as disciplinas cursadas no curso.

Agradeço aos técnicos Dr. Fernando Urban, Ms. Mônica Aparecida de Almeida e a técnica Eliane Morgano por disponibilizarem os laboratórios, assim como ajudar sempre que possível.

Agradeço também ao Felipe Vidal por sempre estar disposto a me ajudar com alguma dúvida em estatística.

Agradeço a secretária Roseli por sempre está disponível para auxiliar com as questões burocráticas e estar disponível para ajudar em outras questões também.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pela oportunidade e a todos os professores pelo conhecimento passado durante esse tempo.

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio durante essa jornada.

RESUMO

CHAGAS, B.R.C. Respostas metabólicas em girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus* após exposição ao zinco, cobre e cádmio. 2019. 98 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba, 2019.

Os metais, no ambiente aquático, podem ser incorporados pela biota local e uma vez incorporados podem acumular nos organismos e resultar, mesmo em nível subletal, em disfunção bioquímica e fisiológica com impacto importante sobre a homeostasia e desempenho metabólico destes animais. Dentro deste contexto, este estudo propôs-se a investigar a atividade das enzimas lactado desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e os níveis dos metabólitos glicose, proteínas e triglicerídeos do fígado, rim e músculo de girinos de rã-touro após a exposição de $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de zinco (Zn), cobre (Cu) e cádmio (Cd) isolados e combinados durante 2 e 16 dias. Nas exposições aos Zn e Cu+Cd a LDH aumentou no fígado (2 dias) e, no rim diminuiu nas exposições ao Cu e Cd. A MDH aumentou no fígado (Cu+Cd e Zn+Cu+Cd, 2 dias), no rim em todos os grupos combinados aos metais (16 dias) e no músculo no grupo exposto ao Cd (16 dias). Os níveis de glicose aumentaram no fígado nos grupos Zn e Cu em 2 e 16 dias de exposição e diminuíram no rim (grupos Cu, Cd e Zn+Cu) e no músculo (Cd) em 2 dias de exposição. Após exposição de 2 dias aos metais as concentrações de proteínas aumentaram no fígado (Zn), no rim em todos os grupos expostos aos metais, exceto nos grupos Cd e Zn+Cu+Cd que não houve alterações, e diminuíram no músculo nos grupos expostos aos metais isolados. Em relação à concentração de triglicerídeos, o rim e o músculo foram os mais afetados, com diminuição nos grupos isolados e nos grupos Zn+Cu e Zn+Cu+Cd em 16 e 2 dias de exposição, respectivamente. Houve interação entre os metais nas enzimas e nos metabólitos nos três órgãos analisados. Portanto, esse estudo mostra que a exposição aos metais alterou o metabolismo normal dos animais e que a utilização desses biomarcadores é válida para investigar os prejuízos que a exposição a xenobióticos pode causar aos anfíbios.

Palavras-Chave: anfíbios, biomarcadores, glicose, LDH, triglicerídeos, MDH, metais, proteínas.

ABSTRACT

CHAGAS, B.R.C. Metabolic responses in tadpoles of bullfrog *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. 2019. 98f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba, 2019.

The metals in the aquatic environment may be incorporated by the local biota and once incorporated may accumulate in organisms and result, even at sublethal level, in biochemical and physiological dysfunctions with important impact on the homeostasis and metabolic performance of these animals. In this context, this study proposes to investigate the activity of lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH) and glucose, protein and triglyceride levels in the liver, kidney and muscle of bullfrog tadpoles following exposure of $1\mu\text{g.L}^{-1}$ of zinc (Zn), copper (Cu) and cadmium (Cd) were isolated and combined for 2 and 16 days. In the exposures to Zn and Cu + Cd the LDH increased in the liver (2 days) and in the kidney decreased in the exposures to Cu and Cd. MDH increased in the liver (Cu + Cd and Zn + Cu + Cd, kidney in all groups combined with metals (16 days) and muscle in the group exposed to Cd (16 days). Glucose levels increased in the liver in the Zn and Cu groups at 2 and 16 days of exposure, and decreased in the kidney (Cu, Cd and Zn + Cu groups) and muscle (Cd) after 2 days of exposure. After 2 days exposure to metals, protein concentrations increased in the liver (Zn) in the kidney in all groups exposed to metals, except in the groups Cd and Zn + Cu + Cd that did not change, and decreased in the muscle in the exposed groups to isolated metals. In relation to the concentration of triglycerides, the kidney and muscle were the most affected, with decrease in the isolated groups and in the Zn + Cu and Zn + Cu + Cd groups at 16 and 2 days of exposure, respectively. There was interaction between the metals in the enzymes and metabolites in the three organs analyzed. Therefore, this study shows that exposure to metals has altered the normal metabolism of animals and that the use of these biomarkers is valid to investigate the damage that exposure to xenobiotics can cause amphibians.

Keywords: amphibians, biomarkers, glucose, LDH, triglycerides, MDH, metals, protein.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Esquema com as enzimas do metabolismo energético e dos metabólitos estudados no presente trabalho marcados em azul. G6P: Glicose-6-fosfato; LDH: lactato desidrogenase; MDH: malato desidrogenase.	19
Figura 2. Esquema dos níveis de organização.	25
Figura 3. Zinco em fragmento cristalino.	26
Figura 4. Cobre nativo	27
Figura 5. Barra de cádmio em forma de cristal	28
Figura 6. Metabolismo dos xenobióticos.	31
Figura 7. Esquema de reação enzimática da LDH.	37
Figura 8. Esquema de reação enzimática da MDH.	38
Figura 9. Reação de oxidação da glicose	38
Figura 10. Reação de determinação de triglicerídeos	39
Figura 11. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	41
Figura 12. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	42
Figura 13. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	43
Figura 14. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	44
Figura 15. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	46
Figura 16. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	47
Figura 17. Concentração de glicose no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	48
Figura 18. Concentração de glicose no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	49
Figura 19. Concentração de glicose no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	50
Figura 20 Concentração de proteína no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	52

Figura 21. Concentração de proteína no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.....	53
Figura 22. Concentração de proteína no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.....	55
Figura 23. Concentração de triglicerídeos no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	56
Figura 24. Concentração de triglicerídeos no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.....	58
Figura 25. Concentração de triglicerídeos no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados.	59
Figura 26. Curva padrão glicose	93
Figura 27. Curva padrão proteínas	93
Figura 28. Curva padrão triglicerídeos	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos resultados apresentados.	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase
Acetil CoA- Acetil coenzima A
Acc- Acetil-Coa carboxilase
Al – Alumínio
ATP- Adenosina trifosfato
Ca - Cálcio
CAT – Catalase
Cd – Cádmió
CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Cu – Cobre
FAS – Ácido graxo sintase
EROs – Espécies reativas de Oxigênio
Fe – Ferro
FMO – Flavinas monooxigenases
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G6P – Glicose-6-fosfato
G6PDH – Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GK – Glicoquiinase
GOD- Glicose Oxidase
GSH – Glutathiona reduzida
GST – Glutathiona-S-transferase
HPI – Hipotálamo-hipófise-interrenal
LDH – Lactato desidrogenase
LPO – Lipoperoxidação
LPL – Lipoproteína lipase
MAO – Monoaminoxidases
MDH – Malato desidrogenase
Mn – Manganês
MT – Metalotioneína
mtGPAT – Glicerol-3-fosfato acetiltransferase
NADH+H⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
Ni – Níquel
NOS – Óxido nítrico sintase
Pb – Chumbo
PCO – Proteínas carbonilas
PFK –Fosfofrutoquinase
PK – Piruvatoquinase
POD - Peroxidase
UDPGT – UDP- glucuronosil-transferase
Zn - Zinco

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1. ORGANISMO TESTE.....	20
3.2. TOXICOLOGIA.....	23
3.3. METAIS NO AMBIENTE.....	26
3.4. ZINCO	26
3.5. COBRE.....	27
3.6. CÁDMIO	28
3.7. ALTERAÇÕES CAUSADAS PELOS METAIS	29
3.8. BIOMARCADORES	31
3.8.1. Biomarcadores de Suscetibilidade.....	32
3.8.2. Biomarcadores de exposição	32
3.8.3. Biomarcadores de efeito	33
3.9. FONTES METABÓLICAS.....	33
4. METODOLOGIA	36
4.1. COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS <i>Lithobates</i> <i>catesbeianus</i>	36
4.2. DETERMINAÇÃO DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	36
4.2.1. Preparo das Amostras	36
4.2.2. Lactato Desidrogenase (LDH)	37
4.2.3. Malato Desidrogenase (MDH).....	37
4.2.4. Glicose	38
4.2.5. Proteínas	38
4.2.6. Triglicerídeos.....	39
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

5. RESULTADOS	40
5.1. LDH.....	40
5.2. MDH.....	43
5.3. GLICOSE	47
5.4. PROTEÍNAS	51
5.5. TRIGLICERÍDEOS	55
6. DISCUSSÃO.....	61
6.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS METAIS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E EXPOSTOS.....	61
6.2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS METAIS ENTRE OS GRUPOS EXPOSTOS AOS METAIS ISOLADOS E COMBINADOS.....	66
6.3. EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS	68
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8. CONCLUSÃO	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
APÊNDICE A – CURVAS PADRÕES	93
ANEXO A - COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS <i>Lithobates</i> <i>catesbeianus</i>	94
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA	96
ANEXO C – TABELAS DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS NOS TECIDOS	97

1. INTRODUÇÃO

Diversos contaminantes podem afetar o ecossistema aquático, dentre os quais se podem citar os fármacos, agroquímicos e os metais (BILA; DEZOTTI, 2003; RUAS *et al.*, 2008; MEMMERT *et al.*, 2013; SAKURAGUI *et al.*, 2013; CAMPANHA *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017). Os contaminantes aquáticos estão entre os maiores causadores da diminuição de espécies de anfíbios em seu habitat natural (COLLINS, 2010; MARCANTONIO *et al.*, 2011).

Neste contexto, nas últimas décadas, um drástico declínio na população de anfíbios tem sido observado no mundo todo, tornando este grupo o mais ameaçado dentre os vertebrados (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; PARK; KIDD, 2005; COLLINS, 2010). Os anfíbios possuem propriedades únicas, tais como a elevada permeabilidade cutânea com rica vascularização da pele e ovos sem casca que possibilitam a absorção de compostos químicos presentes na água, solo ou no ar (TOCHER, 1998; DEGARADY; HALBROOK, 2006; CATENAZZI, 2015; FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015; BRODEUR; CANDIOTI, 2017; CARVALHO *et al.*, 2017), e, no caso dos anfíbios anuros, apresentam ciclo de vida semiaquático, vivendo exclusivamente no ambiente aquático quando girinos e terrestre e/ou aquático após sofrerem metamorfose (MARCANTONIO *et al.*, 2011). Essas características, portanto, tornam os anfíbios bons indicadores de qualidade de água.

Os ambientes aquáticos são constantemente atingidos e contaminados por compostos químicos estranhos aos organismos, denominados xenobióticos, dentre os quais se encontram os metais (VAN DE OOST *et al.*, 2003). Dentre os metais, o zinco (Zn) tem um papel importante na fisiologia do animal, por ser um elemento que apresenta características antioxidantes e responsável pela diminuição de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois ele interage com elementos como o ferro (Fe) e o cobre (Cu), causando uma diminuição da concentração destes elementos nos tecidos e retardando o processo oxidativo, que se dá pela alta concentração de radicais livres que podem ser proveniente destes elementos (WDZIECZACK *et al.*, 1982; WIHELM, 1996; VAGLIO; LANDRISCINA, 1999; LIU *et al.*, 2006).

Metais como Zn e Cu são considerados essenciais para o crescimento de alguns organismos, fazendo parte dos processos metabólicos. O Zn participa de processos antioxidativos e o Cu é um cofator para várias enzimas. Entretanto, quando o aumento da concentração ultrapassa os limites fisiológicos do animal, estes metais podem se tornar tóxicos

(ZIRINO *et al.*, 1972; WDZIECZACK *et al.*, 1982; WILHELM, 1996; VAGLIO; LANDRISCINA, 1999, LIU *et al.*, 2006).

O cádmio (Cd) é um metal não essencial para o organismo e encontrado livremente na natureza e amplamente distribuído por atividades antrópicas. É insolúvel e tóxico para diversos organismos, principalmente os organismos aquáticos, pois é onde mais se encontra o metal (ZIRINO *et al.*, 1972; LINS *et al.*, 2010; EROGLU *et al.*, 2015). A exposição a esses xenobióticos pode acarretar alterações dos processos metabólicos em organismos que vivem neste ambiente (LIU *et al.*, 2010; FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017). Esses compostos podem ser absorvidos por estes organismos e serem metabolizados por um processo denominado biotransformação. A biotransformação torna substâncias que em geral são hidrofóbicas em substâncias hidrofílicas, a fim de facilitar a sua excreção (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Durante o processo de biotransformação e o contato do organismo com os xenobióticos, pode ocorrer a formação de EROs, que são formadas naturalmente pelos organismos aeróbios durante a respiração celular; contudo, outros sistemas endógenos também podem contribuir para a formação desses compostos reativos. Os metais são conhecidos por causar aumento na produção de radicais e de EROs por meio da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) (FENTON, 1984), resultando em peroxidação lipídica, danos no DNA, alteração da homeostase do cálcio e morte celular (STOHS; BAGCHI, 1995; CARVALHO *et al.*, 2008; ABDEL-TAWWAB; WAFEEK, 2017).

Os organismos possuem sistemas fundamentais de defesa celular enzimáticos e não enzimáticos contra os danos causados pelas EROs. Além das defesas antioxidantes utilizadas pelos organismos, a manutenção do metabolismo aeróbio e anaeróbio é crucial para tolerância à exposição a poluentes ambientais, pois os animais estabilizam suas taxas metabólicas para garantir o fornecimento adequado de oxigênio aos tecidos. A exposição a poluentes também pode promover mudanças compensatórias na concentração de reservas de energia e nos níveis de enzimas glicolíticas e estas mudanças podem alterar significativamente as diferentes vias metabólicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; TREVISAN, 2008; CARVALHO *et al.*, 2008; FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015).

Alguns estudos verificaram a toxicidade de metais em peixes e o efeito em algumas vias metabólicas. Destacam-se os de Zhu *et al.* (2013), que verificaram o efeito do Cu na indução de atividades enzimáticas e expressões gênicas envolvidas no metabolismo lipídico em hepatócitos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*), e de Abdel-Tawwab e Wafeek (2017), que verificaram aumento da atividade da piruvatoquinase (PK) e decréscimo das atividades das

fosfofrutoquinase (PFK) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no fígado de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, expostas ao Cd em diferentes temperaturas. As PFK e PK são enzimas regulatórias da glicólise, sendo a PFK uma enzima participante da fase inicial, a PK da fase final e a G6PDH é uma enzima importante da via das pentoses e que utiliza glicose 6-fosfato (G6P) da via glicolítica. Portanto, as alterações observadas nesses estudos demonstram um comprometimento da via metabólica e prejuízo na disponibilidade de energia provocado pela exposição à metais.

Entre as enzimas metabólicas, destaca-se a lactato desidrogenase (LDH) que, apesar de não fazer parte diretamente da via glicolítica, está relacionada com a interconversão do excesso de piruvato a lactato. A LDH é uma enzima que catalisa a oxidação reversível do piruvato em lactato na presença da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida ($\text{NADH}+\text{H}^+$), atuando como aceptora ou doadora de hidrogênio. Durante a oxidação anaeróbia da glicose, a LDH fornece NAD^+ para a reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e, desta forma, mantém a via glicolítica funcionando e constituindo numa indicadora da capacidade anaeróbia da célula (MOTTA, 2000 p. 108; NELSON; COX, 2016, p. 572).

Além disso, o NAD^+ é um transportador de energia e é reduzido a $\text{NADH}+\text{H}^+$, como as células contêm quantidades limitadas de NAD^+ a glicólise logo cessaria caso o $\text{NADH}+\text{H}^+$ gerado nesse passo da glicólise não fosse continuamente oxidado (TREVISAN, 2008). Quando o oxigênio se torna disponível, o lactato pode ser reoxidado. Neste caso, o piruvato é levado, via acetil coenzima A (acetil CoA), para o ciclo de Krebs, com consequente fosforilação oxidativa e formação de gás carbônico e água (NELSON; COX, 2016, p. 572).

Variações no nível de atividade da LDH estão relacionadas com alteração ambiental em peixes. Por exemplo, o aumento da atividade da LDH pode indicar alta atividade anaeróbia, como observado por CARVALHO *et al.* (2008) em fígado de curimatás, *Prochilodus lineatus*, expostos ao Cu em diferentes pHs e temperaturas, e nas tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, expostas ao Cd em diferentes temperaturas (ABDEL-TAWWAB; WAFEEK, 2017). Portanto, considerando o importante papel dessa enzima para o metabolismo celular, uma alteração na sua atividade pode refletir na diminuição na razão NAD^+/NADH que, por sua vez, afetaria inúmeras reações de oxidorredução, incluindo aquelas responsáveis pelo estado funcional dos grupamentos tióis (-SH) celulares, como a glutatona reduzida (GSH). Consequentemente, a diminuição da GSH pode ser suficiente para interromper as funções dependentes de proteínas celulares específicas ligadas ao grupo tiol (JONES, 2008).

Além disso, o fornecimento de equivalentes redutores (NADPH) é obtido pela ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) por meio da transferência de um íon hidreto ao

NADP⁺. Deste modo um desequilíbrio no sistema antioxidante pode ocorrer e a função antioxidante da GSH pode ser afetada, pois o fornecimento de NADPH encontra-se prejudicado, a GSH não pode ser regenerada, podendo causar danos ao metabolismo celular (TREVISAN, 2008; FELÍCIO, 2017).

A malato desidrogenase (MDH) é uma enzima que catalisa a oxidação reversível de L-malato em oxaloacetato na presença de NAD⁺ (RIBEIRO *et al.*, 2015). Além disso, a MDH tem participação na lipogênese e gliconeogênese. Existem duas isoformas em células eucarióticas: MDHc e MDHm. A MDHc é encontrada no citoplasma e desempenha um papel fundamental no sistema de lançadeira malato-aspartato, que é a transferência de equivalentes redutores, para facilitar o transporte de malato do citossol para a mitocôndria. A MDHm é uma enzima mitocondrial que participa no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs) e que reversivelmente converte L-malato em oxaloacetato que, por sua vez, contribui para formação de citrato mitocondrial. O citrato, ao ser transportado ao citoplasma, origina acetil co-A para a biossíntese de lipídios (lipogênese) e o oxaloacetato, que pode ser reduzido a malato pela MDHc (gliconeogênese). O malato pode retornar à matriz mitocondrial, completando o ciclo (NELSON; COX, 2016, p. 571).

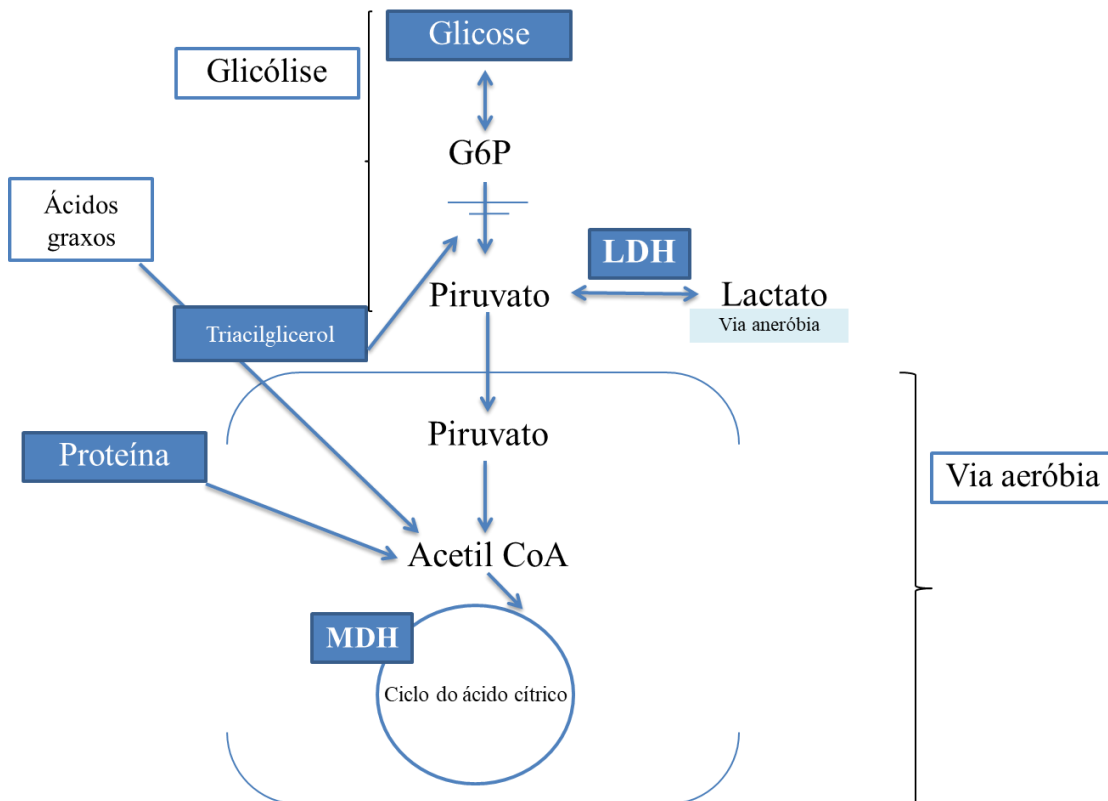
Assim como todos os organismos, os anfíbios também enfrentam a difícil tarefa de distribuir a energia adquirida em proporções adequadas para seu crescimento, manutenção, reprodução e sobrevivência. Neste contexto, os anfíbios estão frequentemente expostos aos contaminantes em seu ambiente natural que podem levar a alterações em sua fisiologia. Frente ao exposto, a proposta desse estudo em expor girinos de *L. catesbeianus* aos metais Zn, Cu e Cd isolados e combinados durante 2 e 16 dias, pretende responder as seguintes questões:

a) verificar se, após os compostos químicos entrarem no organismo, foram distribuídos entre os tecidos e estão provocando um efeito tóxico em alvos críticos, b) quando submetidos a estas alterações os animais podem ser capazes de restabelecer a sua homeostase, por rápida mobilização de reservas energéticas, podendo ser considerado um mecanismo adaptativo permitindo ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição aos metais.

Portanto, nós esperamos confirmar a hipótese de que os metais, isolados e/ou combinados deverão alterar os parâmetros bioquímicos, bem como comprometer o gasto de energia e o desempenho desses animais. Aqui também esperamos que esses animais terão maior probabilidade de apresentar estresse fisiológico, com alterações na atividade das enzimas LDH e MDH e nos níveis de glicose, proteínas e triglicérides.

Assim, a figura 1 apresenta um resumo das enzimas e dos metabólitos analisados no presente trabalho.

Figura 1. Esquema com as enzimas do metabolismo energético e dos metabólitos estudados no presente trabalho marcados em azul. G6P: Glicose-6-fosfato; LDH: lactato desidrogenase; MDH: malato desidrogenase.



Fonte: Adaptado de Souza *et al.*, 2018.

2. OBJETIVOS

Considerando as informações anteriores o objetivo principal deste estudo foi avaliar se a exposição a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos metais Zn, Cu e Cd e suas combinações, durante 2 e 16 dias, é capaz de alterar a atividade das enzimas LDH e MDH e as reservas energéticas em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. Para tanto, pretendeu-se especificamente:

Determinar e analisar os efeitos na atividade enzimática da LDH e MDH e nos níveis de glicose, proteína e triglicerídeos no fígado, rim e músculo de girino de rã-touro, *L. catesbeianus*, após exposição a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos metais Zn, Cu e Cd isolados e suas combinações (1:1 e 1:1:1);

Comparar os efeitos desses metais e suas combinações (1:1 e 1:1:1) na atividade enzimática da LDH e MDH e nos níveis de glicose, lipídeos e proteína no fígado, rim e músculo de girino de rã-touro, *L. catesbeianus* expostos por 2 e 16 dias;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. ORGANISMO TESTE

A espécie *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) é naturalmente distribuída no leste da América do Norte, mas a espécie foi introduzida em diversas regiões do mundo devido à comercialização, principalmente pela alta demanda da utilização da sua carne na culinária e de subprodutos como o couro (CUNHA; DELARIVA, 2009). Por ser uma espécie que pode viver em qualquer ambiente como rios, riachos e lagoas essa espécie foi introduzida no Brasil na década de 30 para a criação do primeiro ranário do país, destinado ao cultivo comercial da carne do animal (CUNHA; DELARIVA, 2009).

A rã-touro foi escolhida pela facilidade de adaptação, rápido crescimento e grande quantidade de ovos em cada desova, além de que a espécie tem uma grande longevidade, podendo viver entre 7 a 9 anos em qualquer ambiente (RODRIGUEZ; LINARES, 2001; CUNHA; DELARIVA, 2009). Cada fêmea pode depositar até vinte mil ovos durante o ano (RODRIGUEZ; LINARES, 2001). Os ovos e as larvas do animal apresentam algumas substâncias que conferem um sabor desagradável aos predadores (RODRIGUEZ; LINARES, 2001; CUNHA; DELARIVA, 2009).

A alimentação de pequenos sapos e girinos é composta de pequenos insetos e outros invertebrados, e sapos maiores e rãs se alimentam de pequenos mamíferos, aves, répteis e outros anfíbios (RODRIGUEZ; LINARES, 2001; CUNHA; DELARIVA, 2009; AFONSO *et al.*, 2010).

O sucesso adaptativo deste animal teve uma boa repercussão, o que resultou num incentivo ao cultivo, causando uma distribuição da espécie para diversas regiões do Brasil. No país, a maior distribuição da espécie está na Mata Atlântica e no Cerrado (CUNHA; DELARIVA, 2009). Hilsdorf e Petrere Jr. (2002) apontam que as espécies exóticas são uma das principais ameaças às espécies nativas da bacia do Rio Paraíba do Sul (Estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais). Outros estudos mostram que a presença da *L. catesbeianus* pode influenciar populações de anuros nativos por causa da predação, competição de alimentos e a sua facilidade de adaptação (ALVES *et al.*, 2008; AFONSO *et al.*, 2010).

Nesse contexto, vários estudos propõem o uso da *L. catesbeianus* como uma espécie-modelo com alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas (BOONE *et al.*, 2007, OSSANA *et al.*, 2013, VERONEZ *et al.*, 2016) e os resultados obtidos poderão, até certo ponto, fornecer subsídios para a criação de normas para a proteção das espécies

endêmicas no Brasil (DE PAIVA MAGALHÕES; FERRÃO-FILHO, 2008; DA SILVA *et al.*, 2015, p. 350)

O uso de espécies nativas necessita de autorização para coleta do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Instituto Chico Mendes, não somente por isso, mas também há dificuldade em se encontrar espécies nativas o ano todo e/ou na época da seca, por exemplo, e nos casos que demandam medidas em longo prazo. Além disso, existe um compromisso da comunidade científica mundial em seguir os Princípios dos 3Rs, de “redução, substituição (*replacement*) e refinamento” no uso de animais, aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) a resolução normativa 17, que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividade de pesquisa, a Lei Arouca. O CONCEA é o órgão responsável pelo tratamento digno, humanitário e ético a todos os animais utilizados em atividades de ensino ou pesquisa científica.

A Resolução Normativa n. 17 referente a lei n. 11794/2008 estabelece que:

Art. 1º Esta Resolução Normativa dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos do inciso III do art. 5 da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, e sua regulamentação.

Art. 2º Para os efeitos desta Resolução Normativa, considera-se:

I – Método Alternativo: qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa;

II – Método Alternativo Validado: método cuja confiabilidade e relevância para determinado propósito foram determinadas por meio de um processo que envolve os estágios de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, o qual está em conformidade com os procedimentos realizados por Centros para Validação de Métodos Alternativos ou por estudos colaborativos internacionais, podendo ter aceitação regulatória internacional;

III – Método Alternativo Reconhecido: é o método alternativo validado que foi reconhecido pelo CONCEA.

Atualmente são conhecidas 7969 espécies de anfíbios no mundo, sendo 7034 anfíbios anuros (AMPHIBIA WEB, 2019). Em 2004, uma avaliação global foi feita e notou-se que 1856 (32%) das espécies estão ameaçadas de extinção, sendo que nas duas últimas décadas houve um número alarmante de extinções. Acredita-se que ao menos 168 espécies foram extintas e pelo menos 2469 tenham declínio de população (AMPHIBIA WEB, 2019). Das 7969 espécies de anfíbios descritas até o momento no mundo, 1086 são encontradas no Brasil, que também

tem maior número de espécies endêmicas de anfíbios (SILVANO; SEGALLA, 2005). Apesar da alta diversidade de anfíbios encontrada no país, o seu declínio está ocorrendo no mundo todo (FROST *et al.*, 2006). As principais causas desse declínio são: destruição do habitat, aumento da radiação ultravioleta, mudanças climáticas, introdução de espécies competidoras, doenças e presença de contaminantes químicos (BLAUSTEIN *et al.*, 2011, FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2016).

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2003) e o Ministério do Meio Ambiente (portarias nos. 444 e 445, de 18 de dezembro de 2014) a mais recente revisão da *Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção* descreveu 41 espécies de anfíbios como ameaçadas e uma extinta, sendo todas da Mata Atlântica. Além disso, mais de 90 espécies foram categorizadas como deficientes em dados, ou seja, não há informações suficientes sobre sua distribuição geográfica, ameaças, impactos, usos, entre outras, não permitindo classificá-las como espécies ameaçadas.

Essas espécies ficam protegidas de modo integral, incluindo, entre outras medidas, a proibição de captura, transporte, armazenamento, guarda, manejo, beneficiamento e comercialização. Dessas espécies, 18 foram listadas como criticamente ameaçadas, entre elas as *Scynax alcatraz*, *Holoaden bradei*, *Paratelmatobius lutzi* e *Odontophrynus moratoi*, que são encontradas apenas em locais isolados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (GARCIA *et al.*, 2009, p. 333, AMPHIBIA WEB, 2019).

Doze espécies foram classificadas como ameaçadas de extinção, dentre elas encontram-se a *Adelophryne maranguapensis*, que é restrita à Serra de Maranguape no Ceará, a *Physalaemus soaresi*, restrita ao Horto Florestal de Santa Cruz, Itaguaí, Rio de Janeiro, a *Hylomantis granulosa*, que ocorre em várias localidades do Nordeste, e a *Thoropa petropolitana* que ocorre na Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro (GARCIA *et al.*, 2009, p. 333, AMPHIBIA WEB, 2019).

Onze espécies consideradas vulneráveis, como a *Adelophryne baturitensis*, restrita a Serra de Baturité, Ceará, a *Thoropa lutzi*, que ocorre no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, e a *Melanophryniscus dorsalis*, encontrada ao longo da costa em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. A *Phrynomedusa fimbriata*, extinta, era conhecida apenas em Paranapiacaba, São Paulo, mas não é vista há mais de 80 anos. Ainda, segundo estas fontes, a maioria das espécies listadas anteriormente têm áreas restritas ou altamente fragmentadas, com perda de habitat e/ou são extremamente difíceis de serem encontradas (GARCIA *et al.*, 2009, p. 333, AMPHIBIA WEB, 2019).

Portanto, o emprego da rã-touro (*L. catesbeianus*) como espécie modelo experimental se dá pela facilidade de sua adaptação e reprodução em laboratório, por ser um organismo de fácil criação, minimizando também a utilização de espécies nativas e/ou ameaçadas de extinção, permitindo assim, que sejam desenvolvidos protocolos e métodos comparados para estabelecer um modelo experimental (RIZZI, 2014; MARCANTONIO *et al.*, 2011).

3.2. TOXICOLOGIA

A toxicologia é uma ciência que foi crescendo junto com a história das civilizações, pois desde sempre o ser humano possuía conhecimento sobre venenos de animais e plantas (HODGSON, 2004, p. 3; OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 3). É a ciência que estuda os efeitos adversos das interações de substâncias químicas com organismos (OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 5; EATON; GILBERT, 2012, p. 6).

Toxicante e/ou contaminante é o nome dado à substância química capaz de causar dano a um sistema biológico, causando alterações fisiológicas e/ou levando a morte e são substâncias produzidas por atividades antropogênicas (OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 5; EATON; GILBERT, 2012, p. 7). O estudo da disposição cinética dos xenobióticos no organismo é feito pela toxicocinética, a qual é didaticamente dividida em quatro principais etapas, a absorção, a distribuição, a biotransformação e a excreção (OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 6; SHEN, 2012, p. 99). Enquanto a toxicodinâmica se refere ao estudo das ações e interações do xenobiótico em sítios de ações, específicos ou não, órgãos, e um possível desequilíbrio homeostático (OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 6; FAUSTMAN; OMENN, 2012, p. 52).

No ambiente se encontram mais de um tipo de xenobiótico ao qual o animal está exposto e quando isso acontece pode ocorrer interações entre eles, sendo essas aditivas, antagônicas e sinérgicas (DE PAIVA MAGALHÕES; FILHO, 2008). Interações aditivas são aquelas em que a toxicidade de dois ou mais contaminantes é a soma dos efeitos do mesmo isolado (OLIVEIRA, 1986; ROSE; HODGSON, 2004, p. 189). Antagonismo é quando um contaminante interfere na ação do outro inibindo, diminuindo ou eliminando, resultando numa diminuição da toxicidade (OLIVEIRA, 1986; ROSE; HODGSON, 2004, p. 190). Sinergismo ocorre quando a toxicidade de um ou mais contaminantes é maior que a soma da toxicidade dos contaminantes isolados (OLIVEIRA, 1986; ROSE; HODGSON, 2004, p. 189).

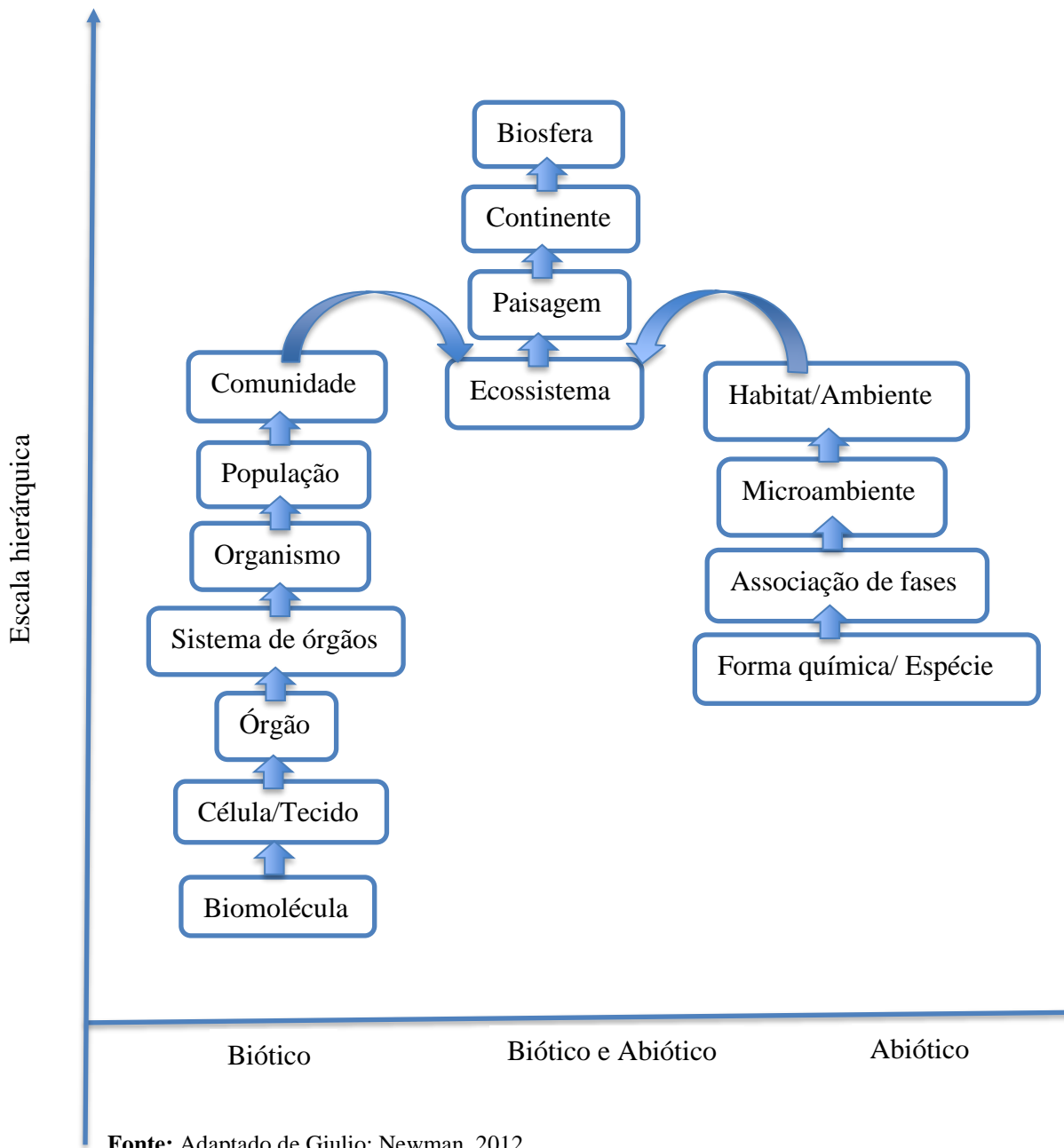
Os xenobióticos podem atravessar as membranas e atingirem a corrente sanguínea por um processo denominado absorção (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012, p. 59). A absorção ocorre pelas principais vias de contaminação, como a via respiratória, a via gastrointestinal e via cutânea (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012, p. 58).

A taxa de distribuição para os órgãos e tecidos é inicialmente determinada pelo fluxo sanguíneo e pela taxa de difusão entre o capilar e as células dos órgãos e tecidos, e a distribuição final depende da afinidade do toxicante com os tecidos (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012, p. 63). O toxicante pode ser armazenado em órgãos e tecidos, ser biotransformado ou excretado (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012, p. 58). Os principais órgãos de armazenamento são o fígado e rins, os tecidos adiposo e ósseo ou também, podem ficar ligados às proteínas plasmáticas, como albumina, transferrina, globulinas, entre outras (LEHMAN-MCKEEMAN, 2012, p. 64). No organismo os toxicantes podem promover injúrias às estruturas biológicas, ou seja, possuem a capacidade de provocar efeitos nocivos aos organismos, a qual é denominada de toxicidade (OGA; SIQUEIRA, 2008, p. 6). Os metais não são transformados pelos organismos, como acontece com compostos orgânicos e possuem capacidade de bioacumulação. Entretanto, todos os metais têm potencial para causar efeitos toxicológicos (GOLOVANOV, 2008).

Como descrito anteriormente, a biotransformação é toda alteração que ocorre na estrutura química das substâncias no organismo para facilitar sua excreção. Esse processo se dá por catalisação de enzimas inespecíficas ou por degradação não enzimática (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2008, p. 16). Em geral, essas alterações acontecem para que as propriedades químicas dessas substâncias passem de favoráveis à absorção (lipofílica) para favoráveis à excreção pela urina e fezes (hidrofílica) (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2008, p. 16; PARKINSON; OGILVIE, 2012, p. 72).

A ecotoxicologia é um ramo da toxicologia onde se estuda os xenobióticos da biosfera e seus efeitos nos componentes do mesmo, seu objetivo é explicar e prever o efeito da exposição a esses contaminantes e a sua ocorrência em vários níveis de organização biológica (Figura 2) (GIULIO; NEWMAN, 2012, p. 392). As respostas comportamentais e fisiológicas são respostas toxicológicas (compensatórias e/ou adaptativas) que refletem o efeito em todos os níveis de organismo e componentes estruturais, e representam a interação de processos fisiológicos com os estímulos ambientais. Portanto, antes que os efeitos possam se mostrar nos níveis de população, comunidade e ecossistema, a resposta de organismos individuais fornece uma boa avaliação do risco de declínio e/ou extinção local de alguns grupos de organismos susceptíveis (GIULIO; NEWMAN, 2012, p. 392). Dentro da ecotoxicologia há mais duas divisões de pesquisa: a toxicologia terrestre, que estuda o efeito dos xenobióticos nos ecossistemas terrestres e a toxicologia aquática, que estuda o efeito dos xenobióticos nos organismos aquáticos, entre esses xenobióticos, estão os metais (GIULIO; NEWMAN, 2012, p. 391).

Figura 2. Esquema dos níveis de organização.



3.3.METAIS NO AMBIENTE

A legislação brasileira, segundo a resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 17 de março de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, estabelece como limite máximo para a proteção das comunidades aquáticas $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zn total, $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu dissolvido e $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd total em água doce, e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zn total, $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu dissolvido e $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd total em águas salinas e salobras. Entretanto, metais como o Zn, Cu e Cd têm sido registrados em ecossistemas aquáticos em níveis acima do estabelecido pela legislação brasileira (CHIBA *et al.*, 2011, MEDEIROS *et al.*, 2013, PEDRAZZI *et al.*, 2014, CONCEIÇÃO *et al.*, 2015). O impacto de metais sobre a fauna aquática pode ser avaliado por meio de testes de toxicidade, que possibilitam a determinação dos limites aceitáveis para diferentes substâncias (HARE, 1992; SHULKIN; KAVUN, 2018; FREITAS *et al.*, 2018).

3.4. ZINCO

Zinco (Zn) é um metal de transição pertencente a 4º período e grupo IIB, com número atômico 30, massa 65,4, densidade $7,14 \text{ g cm}^{-3}$, ponto de fusão $419,5^\circ\text{C}$ e ebulição 906°C (Figura 3) (WUANA; OKIEIMEN, 2011). O Zn é um elemento essencial para a função enzimática normal nas vias metabólicas e é utilizado no tratamento de distúrbios de pele e resfriado comum, mas sua ingestão excessiva pode causar anemia e danos no pâncreas e rins em humanos (HEIN, 2003).

Figura 3. Zinco em fragmento cristalino.



Fonte: Quimlab¹

Esse metal está presente em diversas enzimas, como anidrase carbônica, álcool desidrogenase, superóxido dismutase e RNA polimerase. O Zn é necessário para formação de carboidratos e para a catálise de processos oxidativos (NAGAJYOTI *et al.*, 2010).

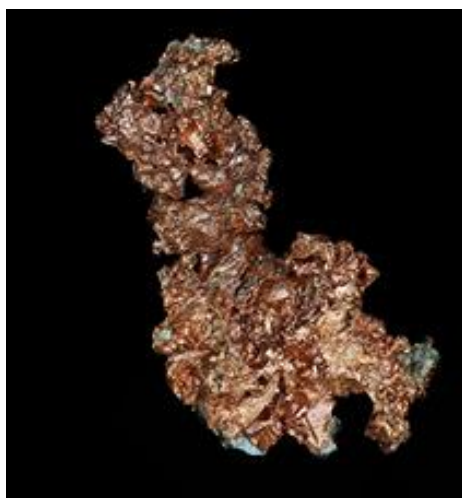
¹ Disponível em <<http://www.quimlab.com.br/guiadoselementos/zinco.htm>> Acesso em: 20 nov. 2018.

Esse metal é encontrado naturalmente em rochas, mas sua concentração tem aumentado na natureza devido às atividades antropogênicas, tais como atividades industriais, mineração, combustão de resíduos e processamento de aço. O Zn pode ser encontrado em alimentos e em água potável (WUANA; OKIEIMEN, 2011). Entretanto a produção industrial e/ou local com resíduos tóxicos pode aumentar a concentração de Zn em ambientes aquáticos causando danos aos organismos (WUANA; OKIEIMEN, 2011).

3.5. COBRE

O cobre (Cu) é um metal de transição que pertence ao 4º período e grupo IB da tabela periódica com número atômico 29, peso atômico de 63,5, densidade $8,96\text{g cm}^{-3}$, ponto de fusão 1083°C e ebulição 2595°C (Figura 4) (WUANA; OKIEIMEN, 2011). Cu é o terceiro metal mais utilizado no mundo utilizado na fabricação de máquinas industriais, de construção e, para os organismos, é um micronutriente essencial utilizado no crescimento de plantas, atuando como no transporte eletrônico durante a fotossíntese e atua na oxidase do citocromo (WUANA; OKIEIMEN, 2011; STRYDOM *et al.*, 2006).

Figura 4. Cobre nativo



Fonte: Museu das minas e dos metais.²

Considerado um metal essencial, o Cu tem participação em diversos processos bioquímicos, como exemplo, é requerido para atividades das enzimas associadas com o metabolismo do Fe^{2+} , enzimas associadas com a formação da elastina e do colágeno, na atividade da proteína ceruloplasmina responsável pela oxidação de íons de ferro que atuam como catalisadores na reação de produção de EROs (HALLIWELL; GURTERIDGE, 1984;

² Disponível em: <<http://www.mmgerdau.org.br/descubra/inventario-mineral/cobre-nativo/>> Acesso: 12 fev 2019.

HERKOVITS; HELGUERO, 1998). Apesar de ser um metal essencial para os processos metabólicos, em altas concentrações pode afetar negativamente os organismos a ele expostos, como exemplo, penetrar hemácias causando hemólise liberando assim hemoglobina resultando em uma deficiência renal (HERKOVITS; HELGUERO, 1998; WUANA; OKIEIMEN, 2011).

A concentração de Cu no ambiente está crescendo cada vez mais devido às atividades antropogênicas de fundição, mineração, indústrias, emissões de resíduos domésticos e aplicação de fertilizantes, algicidas e fungicidas (FLEMMING; TREVORS, 1989).

3.6. CÁDMIO

O cádmio (Cd) encontra-se na segunda linha dos elementos de transição com número atômico 48, peso atômico 112,4, densidade $8,65 \text{ g cm}^{-3}$, ponto de fusão $321,1^\circ\text{C}$, e ponto de ebulição de 765°C (Figura 5) (WUANA; OKIEIMEN, 2011). É um metal não essencial amplamente distribuído por atividades antrópicas e indústrias (BAKER *et al.*, 2003; LINS *et al.*, 2010; EROGLU *et al.*, 2015).

Figura 5. Barra de cádmio em forma de cristal



Fonte: Heinrich Pniok, 2010.³

O Cd apresenta propriedades químicas semelhantes ao Zn, o que facilita sua distribuição e aumenta o risco de contaminação (SPIRO; STIGLIANI, 2009; WUANA; OKIEIMEN, 2011). Além disso, o Cd é amplamente distribuído em associação com o Zn, o que faz com que ele seja absorvido por plantas e animais, causando uma intoxicação nestes organismos quando há a substituição do Zn pelo Cd, alterando os processos metabólicos ao qual o Zn faz parte (SPIRO; STIGLIANI, 2009; WUANA; OKIEIMEN, 2011).

O Cd pode ser encontrado em solos, águas e alimentos (STRYDOM *et al.*, 2006; SPIRO; STIGLIANI, 2009; WUANA; OKIEIMEN, 2011). Esse metal pode ser utilizado em baterias de níquel, liga das indústrias siderúrgicas, nos pigmentos usados em impressoras, plásticos,

³ Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Alchemist-hp>> Acesso em 20 nov 2018.

componentes eletrônicos, como impurezas em alguns produtos, como fertilizantes fosfatados, detergentes e produtos de refinaria de petróleo, além de ser um subproduto da refinaria de Zn (STRYDOM *et al.*, 2006; SPIRO; STIGLIANI, 2009; WUANA; OKIEIMEN, 2011; NAGAJYOTI *et al.*, 2010).

O aumento na utilização de equipamentos elétricos e eletrônicos gera a poluição por diversos tipos de metais, inclusive o Cd (MEDINA *et al.*, 2016). Nas plantas expostas ao Cd, é possível observar diminuição na produção de clorofila e inibição de crescimento (DAS; SAMANTARY; ROUT, 1997; TOPPI; GABBRIELLI 1999; WOJCIK; TUKIENDORF 2004; MOHANPURIA *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2008).

Em relação aos anfíbios, estudos comprovaram que esse metal tem efeitos nocivos na sua sobrevivência, crescimento e comportamento (JAMES; LITTLE, 2003; GROSS *et al.*, 2007). Os efeitos deste metal foram avaliados em *L. catesbeianus* por Dal-Médico *et al.* (2014), que observaram efeito negativo sobre a função cardíaca após exposição ao Cd ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) e Medina *et al.* (2016), que verificaram no fígado e rim do sapo-da-areia *Rhinella arenarum* após exposição aguda ao Cd alteração em vários parâmetros bioquímicos e histológicos.

3.7. ALTERAÇÕES CAUSADAS PELOS METAIS

Os ambientes aquáticos estão constantemente suscetíveis de serem atingidos e contaminados por xenobióticos como, por exemplo, agroquímicos, nanopartículas, fármacos, metais etc. Os xenobióticos podem ser encontrados também no solo e nos mananciais (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2001; GIROTTO *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2011; GOVEIA *et al.*, 2011).

No que se refere aos metais, estes entram naturalmente no ambiente aquático por meio do desgaste da crosta terrestre. Além do intemperismo geológico, as atividades humanas também introduziram grandes quantidades de metais no ambiente, por meio de resíduos industriais, de agriculturas, zonas urbanas e rurais (FORSTNER; WITTMANN, 1983; MARCANTONIO *et al.*, 2011).

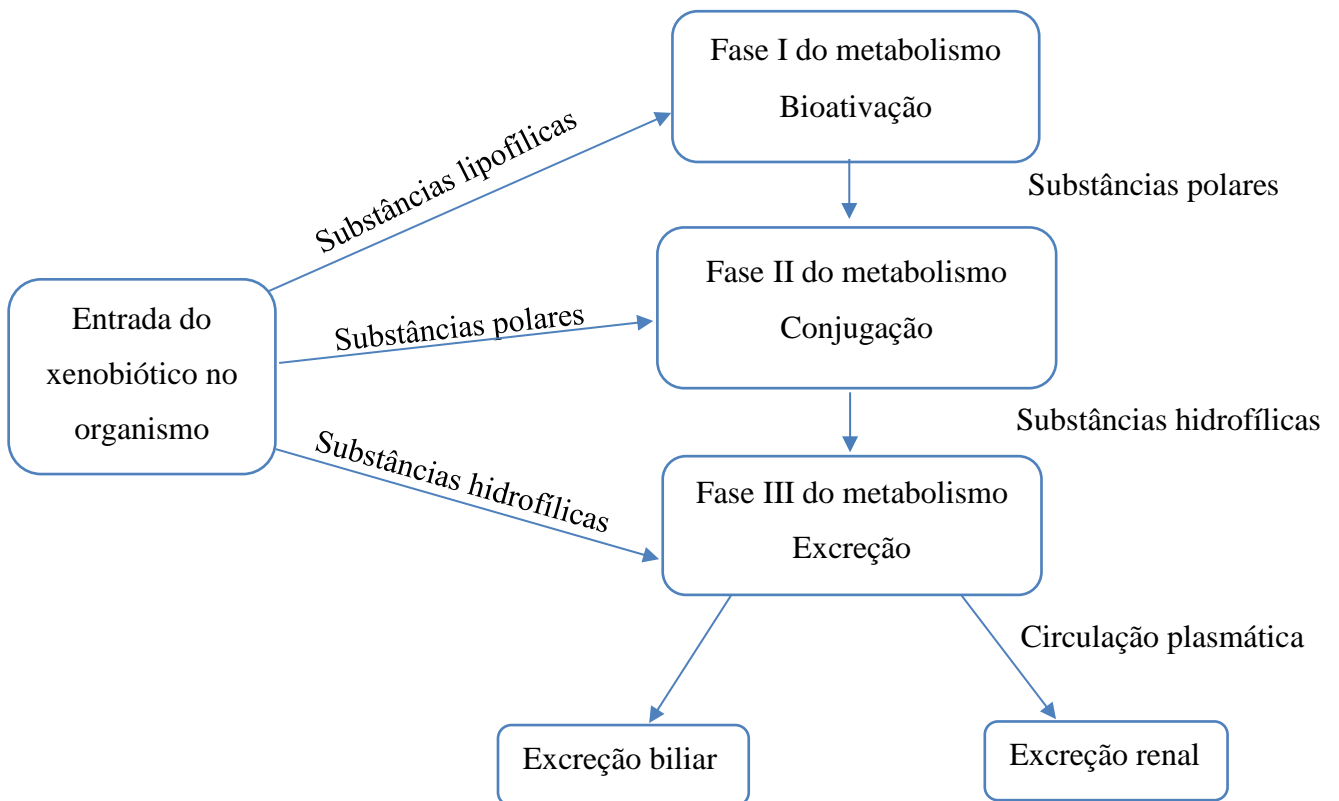
No Brasil, a contaminação por metais no ambiente aquático é proveniente de descargas de esgoto urbano e efluentes industriais. Chiba *et al.* (2011) verificaram em uma sub-bacia em São Carlos, SP, $44\text{-}122 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Zn, $4\text{-}85 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu e $1\text{-}5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd, enquanto Medeiros *et al.* (2013) verificaram em Americana, SP, concentrações de $113\text{-}4489 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Zn, $16\text{-}244,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu e $1\text{-}3,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd. No rio Sorocaba, SP, Pedrazzi *et al.* (2014) verificaram a presença de vários metais como: alumínio (Al), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e Zn dentro dos valores máximos permitidos para águas de Classe 2 pela Resolução do CONAMA

357 (2005) no período chuvoso. Enquanto que Conceição *et al.* (2015) verificaram que as concentrações desses metais estavam acima dos valores estabelecidos pela legislação tanto no período seco quanto no chuvoso dissolvidos na Bacia do Alto Sorocaba (São Paulo).

Os metais não essenciais são considerados os mais perigosos, pois a exposição contínua de organismos aquáticos à sua baixa concentração pode resultar em bioacumulação e transferência para o ser humano por meio da cadeia alimentar (DE CARVALHO DORES; DELAMONICA-FREIRE, 2001; WARREN; HAACK, 2001). Além disso, os metais sendo compostos estáveis, não são facilmente removidos por oxidação e, no ambiente, podem ser absorvidos por organismos que nele vivem e iniciar a biotransformação (Figura 6) (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

As reações de biotransformação são divididas em três fases. Fase I, na qual o xenobiótico é metabolizado por diversos sistemas enzimáticos em um composto mais hidrofílico (mais polar) adicionando novos grupos funcionais ou transformando os já existentes. As reações dessa fase são oxidação, redução e hidrólise. As principais enzimas participantes nessa fase são as da família de enzima do citocromo P450, as monoaminoxidases (MAO) e as flavinas monooxigenases (FMO) (LIVINGSTONE, 1998; IYER; SINZ, 1999; PARKINSON; OGILVIE, 2012, p. 87; DONATO; CASTELL, 2003).

A Fase II é a fase de conjugação, que estabelece uma ligação covalente entre o xenobiótico com as enzimas participantes desta fase, ou liga um dos seus metabólitos a um composto solúvel em água, como exemplo temos o tripeptídeo GSH (PARKINSON; OGILVIE, 2012, p. 95, FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005). A reação de conjugação aumenta a solubilidade, facilitando a excreção do conjugado mais hidrossolúvel (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005). Entre as principais enzimas da Fase II estão as glutationa-S-Transferase (GST), UDP- glucoronosil-transferase (UDPGT), catalase (CAT), entre outras (STRYDOM *et al.*, 2006; FONTAÍNHAS-FERNANDES 2005). Por último, na Fase III, temos as peptidases, hidrolases e β -liases, que catalisam o catabolismo dos metabólitos conjugados na Fase II para formar produtos excretáveis (VAN DER OOST *et al.*, 2003, STRYDOM *et al.*, 2006).

Figura 6. Metabolismo dos xenobióticos.

Fonte: Adaptado de Strydom *et al.*, 2006.

3.8. BIOMARCADORES

Inicialmente, os biomarcadores eram considerados indicadores de alterações funcionais, em sistemas biológicos ou amostras provocadas pela exposição do organismo a determinados poluentes e expressos em termos de organização biológica a um nível inferior ao de organismo (HENDERSON *et al.*, 1987). Adams (1990) alterou essa definição, ao incluir características dos organismos, populações ou comunidades que respondessem às alterações ambientais.

Depledge (1994) e Peakall (1994) consideraram o conceito de biomarcador como sendo uma resposta biológica de nível molecular, bioquímico, celular e fisiológico ou comportamental, que pode ser medida nos tecidos ou fluidos corporais ou em um nível mais complexo, no organismo, indicando a presença ou o efeito de um ou mais poluentes.

Van Gestel e Van Brummelen (1996) redefiniram os termos bioindicadores, biomarcadores e indicador ecológico em níveis de organização biológica, considerando biomarcador como sendo uma resposta biológica a uma exposição química em nível subindividual medido em um organismo ou seus produtos (urina, fezes, sangue, cabelo etc). Diferente de bioindicador que é um organismo capaz de indicar uma alteração ambiental pela

sua presença, ausência ou mudanças comportamentais. Por fim, indicador ecológico consiste em um parâmetro do ecossistema, descrevendo a estrutura e funcionamento dos ecossistemas (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Biomarcadores são compreendidos como quaisquer medidas que indicam interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, químico, físico ou biológico (AMORIN, 2003; STRIMBU; TAVEL, 2010). Como exemplos de biomarcadores estão: alterações em parâmetros sanguíneos, alterações nos tecidos e atividades enzimáticas (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Henderson *et al.* (1987) e WHO (1993) dividiram os biomarcadores em três classes: os de suscetibilidade, que indicam quais fatores podem aumentar ou diminuir o risco individual no desenvolvimento da resposta a exposição de agentes tóxicos. Os biomarcadores de exposição, que medem a distribuição da substância química ou seu metabólito por meio do organismo. E os biomarcadores de efeito, que medem a interação das substâncias químicas com os receptores biológicos.

3.8.1. Biomarcadores de Suscetibilidade

Os biomarcadores de suscetibilidade indicam a capacidade que um organismo tem ou adquire para responder à exposição a um xenobiótico específico, incluindo fatores genéticos e alterações de receptores celulares que alteram a susceptibilidade de um organismo a esta exposição (VAN DER OOST *et al.*, 2003; AMORIN 2003). Esses biomarcadores indicam quais fatores aumentam ou diminuem o risco individual para a resposta a uma exposição a xenobióticos. Como exemplos de biomarcadores de suscetibilidade, temos as enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH); Glutathione-S-transferase (GST) e a Paraxonase (AMORIN, 2003).

3.8.2. Biomarcadores de exposição

Os biomarcadores de exposição são denominados como de “dose interna”, pois se avalia a distribuição da substância no organismo. Detectando e medindo substância exógena ou seu metabólito e/ou o resultado de uma interação entre o xenobiótico e a molécula e/ou célula alvo que está sendo avaliada (AMORIN, 2003; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Estes podem ser utilizados para confirmar a exposição de indivíduos ao contaminante (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FONTAÍNHAS-FERNANDES 2005). Sua resposta pode ser somente em relação à

exposição ao contaminante, como pelo metabolismo resultantes da interação entre o contaminante e o organismo (AMORIN, 2003; IGLESIAS, 2015).

Para melhor escolha de indicador de dose interna é necessário conhecimento prévio do comportamento cinético do agente químico e conhecimento do tempo de permanência desta substância no organismo (AMORIN, 2003). Entre os exemplos de biomarcadores de exposição estão benzeno, medido em sangue e o ácido hipúrico e a concentração de Cd, que são medidos na urina (AMORIN, 2003).

3.8.3. Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito são aqueles que refletem a interação da substância química com os receptores biológicos, incluindo alterações bioquímicas, fisiológicas, entre outras, medida em fluidos corporais ou tecidos de um organismo, podendo estar associados com uma possível doença (VAN DER OOST *et al.*, 2003, AMORIN 2003). Esses biomarcadores de efeito são utilizados também para a prevenção, sendo possível medir uma alteração em estágio ainda reversível, ou seja, quando ainda não foram observados danos à saúde (AMORIN, 2003).

Alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de biomarcadores de efeito. Levando em consideração que essas alterações precedem os danos estruturais, a detecção dessas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma exposição excessiva e intervenções para prevenir doenças (RUDIGER, 1999; AMORIN, 2003).

Dentre os biomarcadores de efeito, há aqueles que estão diretamente envolvidos com a avaliação da ação de determinada substância no órgão-alvo, sendo eles biomarcadores de nefrotoxicidade, genotoxicidade, neurotoxicidade e hepatotoxicidade (WHO, 1991; AMORIN, 2003). Entre os exemplos desses biomarcadores temos também lipoperoxidação (LPO), proteínas carbonilas (PCO) e metalotioneína (MT), enzimas antioxidantes, enzimas óxido nítrico sintase (NOS), acetilcolinesterase (AChE), além de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e os níveis de proteína, glicose, glicogênio e lipídeos (AMORIN, 2003).

Assim, o efeito de contaminantes ambientais na produção de energia e na biossíntese pode ser examinado avaliando-se os níveis de atividade das principais enzimas metabólicas e a concentração de intermediários metabólicos nos tecidos de animais (AMORIN, 2003).

3.9. FONTES METABÓLICAS

Os organismos aquáticos, como os peixes e anfíbios, são expostos a diferentes tipos de estressores na natureza e/ou em condições artificiais, como na aquicultura (BARTON, 2002).

Os estressores podem produzir efeitos que provocam um conjunto coordenado de respostas fisiológicas compensatórias e/ou adaptativas, permitindo que o animal supere a ameaça; estas respostas são agrupadas como primárias, secundárias e terciárias (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

As respostas primárias envolvem respostas neuroendócrinas iniciais e incluem a liberação de catecolaminas do tecido cromafim e a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI), culminando na liberação de hormônios corticosteróides para a circulação (BARTON, 2002). A ação destes hormônios nos diferentes órgãos resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias que incluem alterações nos íons e metabólitos no plasma e nos tecidos e características hematológicas, todas relacionadas aos ajustes fisiológicos no metabolismo, respiração, estado ácido-básico, equilíbrio hidromineral, função imunológica e respostas celulares (MOMMSEN *et al.*, 1999). Ainda em relação aos efeitos metabólicos, pode ocorrer hiperglicemia, diminuição das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999). Além disso, ocorrem respostas terciárias, que se referem a aspectos do desempenho dos animais, como mudanças no crescimento, condição, resistência geral a doenças, atividade metabólica, comportamento e, finalmente, sobrevivência (BARTON, 2002).

A resposta ao estresse é fundamentalmente uma resposta regulatória para devolver o animal à homeostase (SCHRECK, 2010) e, devido a esse papel significativo, o comprometimento da resposta ao estresse pode afetar adversamente a saúde destes animais (CERICATO *et al.*, 2009).

As águas superficiais recebem escoamento e descargas de fontes urbanas, agrícolas e domésticas que podem levar ao acúmulo de contaminantes contendo misturas de compostos tóxicos. Os contaminantes presentes na água são estressantes, mas também podem prejudicar a resposta ao estresse dos anfíbios, por exemplo, a um segundo estressor (BARTON, 2002; CERICATO *et al.*, 2009). Em relação a essas respostas, estudos apontam que a exposição ao metal causa um aumento das reservas metabólicas para a desintoxicação e a manutenção da homeostase em peixes (LIU *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017).

Em anuros, a energia é armazenada na forma de carboidratos, proteínas e lipídeos. A principal forma de estoque energético é em forma de lipídeos, dentro do fígado, da gordura corporal e dos tecidos somáticos e reprodutivos, como ovários e ovos (FITZPATRICK, 1976).

O principal substrato oxidativo para a maioria dos organismos é a glicose. Esse carboidrato é considerado a fonte universal de energia, pois atende à demanda energética desses

organismos. A glicose é o único substrato que algumas células e tecidos, como hemácias e tecido nervoso, oxidam para produzir energia (CAMPBELL, 2004, p. 442). Segundo Van de Oost *et al.* (2003) e De Jesus e De Carvalho (2008), a molécula da glicose pode ser mais sensível a certos tipos de xenobióticos e/ou ainda a níveis de hormônios esteróides no sangue. O cortisol é um hormônio que tem função de estimular a quebra do glicogênio no fígado, para que ocorra a liberação de energia em forma de glicose a fim de manter a homeostase energética. Estudos mostram que as alterações nos níveis de glicose estão relacionadas com alterações nos níveis do cortisol em peixes (STRYDON *et al.*, 2006; MARIANO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2009).

A proteína e os lipídios são nutrientes importantes na mobilização e formação de tecido corporal, sendo os principais responsáveis pelo crescimento dos organismos. Em relação a proteína Maes *et al.* (2016) verificaram aumento na concentração deste metabólito após exposição a 10, 50 ou 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Cu em músculo branco do peixe *Rutilus rutilus*. Carvalho *et al.* (2017) verificaram, em girinos de rã-touro *L. catesbeianus* expostos ao Zn, Cu e Cd, aumento da metalotioneína (MT) no fígado, rim e músculo. Esse aumento poderia representar uma resposta do estresse oxidativo induzido pela exposição aos metais e/ou a ativação de síntese proteica envolvidas com os mecanismos de defesa. A MT é a proteína responsável pela homeostase de metais essenciais e desintoxicação de metais (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Ademais, a estrutura primária de uma proteína pode ser muito variável, o que facilita a ocorrência de processos oxidativos. Esses processos podem ocorrer pelo ataque direto de EROs a sua estrutura, com isso elas também podem ser utilizadas como biomarcadores (TREVISAN, 2008). O processo de oxidação pode fornecer derivados carbonílicos e os grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas por meio de reação com os aldeídos derivados da lipoperoxidação (LPO) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A formação de proteínas carbonilas (PCO) tem atraído grande atenção como um biomarcador devido a sua natureza irreversível e irreparável (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os lipídeos são uma fonte de reserva energética utilizada por diversos animais, com isso, é importante que se estude os efeitos dos xenobióticos na concentração dos lipídeos. Nesse sentido, muitos biomarcadores envolvidos no metabolismo lipídico são utilizados para essa investigação, tais como, a atividade da glicoquinase (GK), enzima responsável pela fosforilação da glicose e da lipoproteína lipase (LPL), que é responsável pela hidrólise dos triglicerídeos (LUCIA *et al.*, 2010). Outros parâmetros estudados são as expressões gênicas das enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, podendo ser uma resposta à exposição a metais como o Cd, tais como acetil-CoA carboxilase (acc) e ácido graxo sintase (fas), além da quantificação

de triglicerídeos (PILO; GEORGE, 1983; IYNEDIJAN, 1993; LUCIA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2013).

Triglicerídeos é o nome que se dá a combinação do glicerol com ácidos graxos. Diferente dos outros lipídeos, este fica acumulado em tecido adiposo, construindo assim uma reserva energética (CAMPBELL, 2004, p. 206). Estudos demonstraram que os metais Zn, Cu e Cd presentes tanto na água como na dieta podem prejudicar os processos normais do metabolismo lipídico dos peixes, reduzindo o conteúdo lipídico e influenciando na atividade das enzimas envolvidas neste metabolismo (LIU *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017). Alguns estudos mostram que as alterações na concentração de triglicerídeos podem estar relacionadas com a disfunção no metabolismo lipídico causado pela exposição a xenobióticos em anfíbios (HIGLEY *et al.*, 2013; MEDINA *et al.*, 2016).

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS *Lithobates catesbeianus*

Este estudo faz parte do projeto o qual teve financiamento da FAPESP sob o no. 50752-3/2011. Os experimentos de exposição aos metais foram realizados e finalizados e os tecidos foram congelados em biofreezer -80°C. A metodologia do experimento, aclimatação e coleta dos tecidos foram realizadas de acordo com a dissertação “Estresse oxidativo em fígado de girinos de rãs-touro expostos a cádmio, zinco e cobre” da aluna Heidi Samantha Moraes Utsunomiya. (ANEXO A)

Este estudo teve aprovação do Comitê do Conselho de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) protocolo no. 2477200318 e aprovação no. 017/2011 (ANEXO B).

4.2.DETERMINAÇÃO DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1. Preparo das Amostras

As amostras foram homogeneizadas em 300 µL de PBS pH 7,2 (tampão de fosfato salina, contendo 1,365 M de NaCl, 0,027M de KCl, 0,054 M de Na₂HPO₄ (7H₂O), 0,018M de KH₂PO₄ com o auxílio do homogeneizador IKA 10® a -4°C. Ao homogenado obtido foram acrescentados 600 µL, e os tubos centrifugados a 12000g durante 20 minutos a 4 °C. Logo após esse procedimento 200 µL de sobrenadante foram separados em microplacas e armazenados em

biofreezer -80°C para as determinações bioquímicas. A preparação do homogeneizado foi realizada no Laboratório Didático de Fisiologia Animal e Vegetal da Universidade Federal de São Carlos no campus Sorocaba.

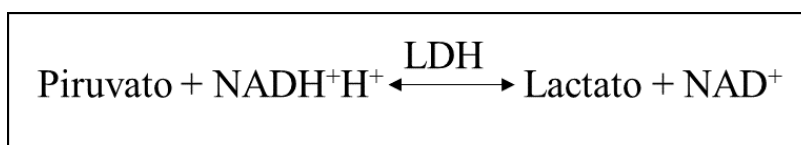
Durante a realização das determinações bioquímicas as amostras foram mantidas em gelo e/ou preparadas sobre superfície gelada para minimizar a degradação do material analisado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

As determinações bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioclima, da Universidade Federal de São Carlos no Campus Sorocaba.

4.2.2. Lactato Desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada de acordo com o método descrito por Bergmeyer (1974). O ensaio enzimático foi realizado em meio contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, piruvato 1 mM e NADH 0,14 mM. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm a 25°C e expressa como Unidade Internacional de Enzima (UI) por miligrama de proteína por minuto (UI.mg de proteína). Nas condições do ensaio, a LDH catalisa a redução do piruvato em lactato com suporte coenzimático da $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Figura 7). O coeficiente de extinção do $\text{NADH}+\text{H}^+$ ($6,22\text{ cm}^{-1}\text{ }\mu\text{mol}^{-1}$) foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

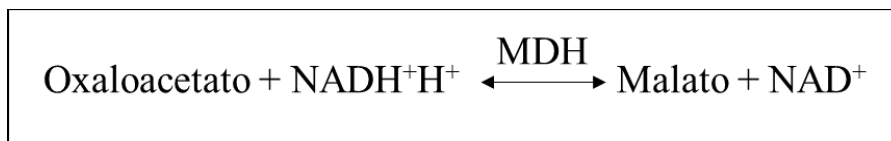
Figura 7. Esquema de reação enzimática da LDH.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.3. Malato Desidrogenase (MDH)

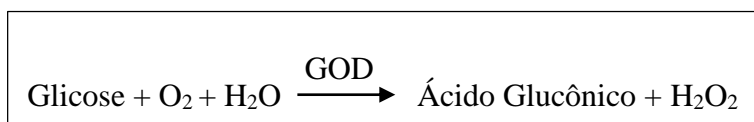
A atividade da MDH foi determinada de acordo com o método descrito por Childress e Somero (1979). O ensaio enzimático foi realizado em meio contendo tampão Tris-HCL 50 mM, MgCl_2 10 mM, pH 7,4, ácido oxaloacético 0,4 mM e NADH 0,14 mM. Nas condições do ensaio, a MDH catalisa a conversão do oxaloacetato em malato com suporte coenzimático da $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Figura 8). A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm a 25°C e expressa como Unidade Internacional de Enzima (UI) por miligrama de proteína por minuto (UI.mg de proteína). O coeficiente de extinção do $\text{NADH}+\text{H}^+$ ($6,22\text{ cm}^{-1}\text{ }\mu\text{mol}^{-1}$) foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

Figura 8. Esquema de reação enzimática da MDH.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.4. Glicose

Para a análise da concentração de glicose foi utilizado o Kit Labtest, Liquiform nº 133. A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose, presente na amostra, em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este, em presença de 4-aminoantipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase (POD) leva a formação de antipirilquinonimina, um composto rosa avermelhado a 505 nm (Figura 9). A intensidade da cor é proporcional a quantidade de glicose na amostra. O sistema de reação foi adaptado para volumes menores de amostras com a construção de uma curva padrão de glicose para confirmação de linearidade. A concentração de glicose foi expressa como mg.dL⁻¹ de acordo com a equação obtida pela curva (Apêndice A).

Figura 9. Reação de oxidação da glicose

Fonte: Kit Labtest para quantificação de glicose.

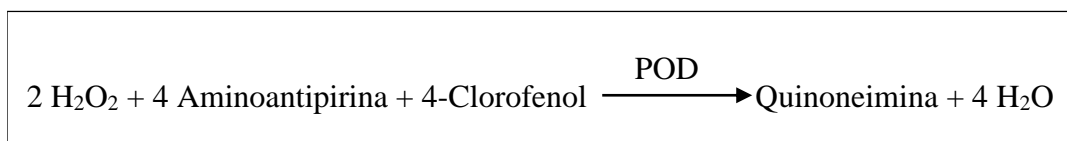
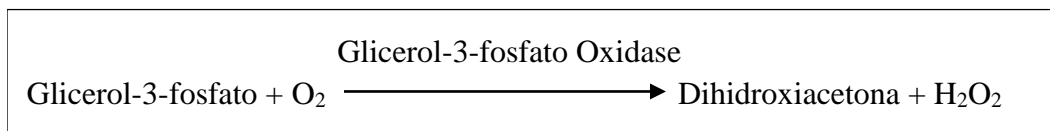
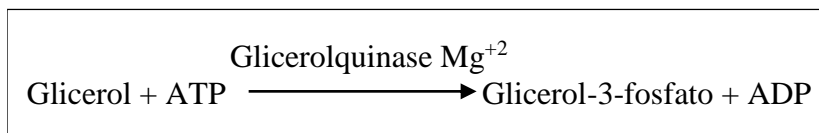
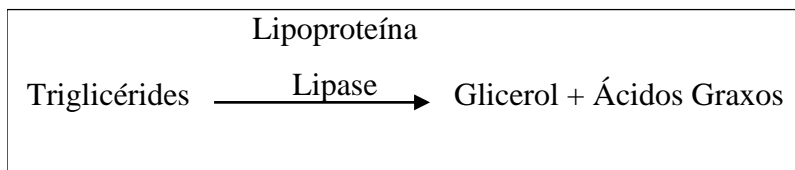
4.2.5. Proteínas

A análise de concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A albumina sérica bovina foi utilizada como padrão proteico para a construção da curva. As concentrações foram determinadas em espectrofotômetro a 595 nm em leituras de microplaca Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek. Os resultados foram expressos como mg.mL⁻¹ de acordo com a equação obtida pela curva (Apêndice A).

4.2.6. Triglicerídeos

Para a análise da concentração de triglicerídeos foi utilizado o Kit Labtest Liquiform nº. 87 133. A reação se baseia na ação da lipase, que promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos, contidos na amostra. O glicerol, por ação da glicerolquinase, é convertido em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerol-3-fosfato oxidase. Posteriormente, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol catalisada pela peroxidase (POD), produzindo uma quinoneimina que tem máxima absorbância em 505 nm (Figura 10). O sistema de reação foi adaptado para volumes menores, em microplacas com a construção de uma curva padrão de triglicerídeos para confirmação de linearidade. A concentração de triglicerídeos foi expressa como mg.dL de acordo com a equação obtida pela curva (Apêndice A).

Figura 10. Reação de determinação de triglicerídeos



Fonte: Kit Labtest para quantificação de triglicerídeos.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como valores médios \pm 1 D.P.M. O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras e o teste F foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias (GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software, USA). Para comparações entre os grupos controle e grupos expostos foi utilizado o teste de uma via (one-way) ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), também foi realizado o teste de comparação Tukey's (paramétrico) e o Dunn's (não paramétrico). Para comparação entre o tempo de exposição e as exposições foi utilizado o teste de duas vias (two-way) ANOVA. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Todos os testes foram realizados usando o GraphPad Prism 6 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS

Nos bioensaios realizados, os girinos de *L. catenellus* sobreviveram em todas as condições propostas, isto é, nos controles, nas exposições aos metais isolados e combinados e nos tempos de 2 e 16 dias. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão

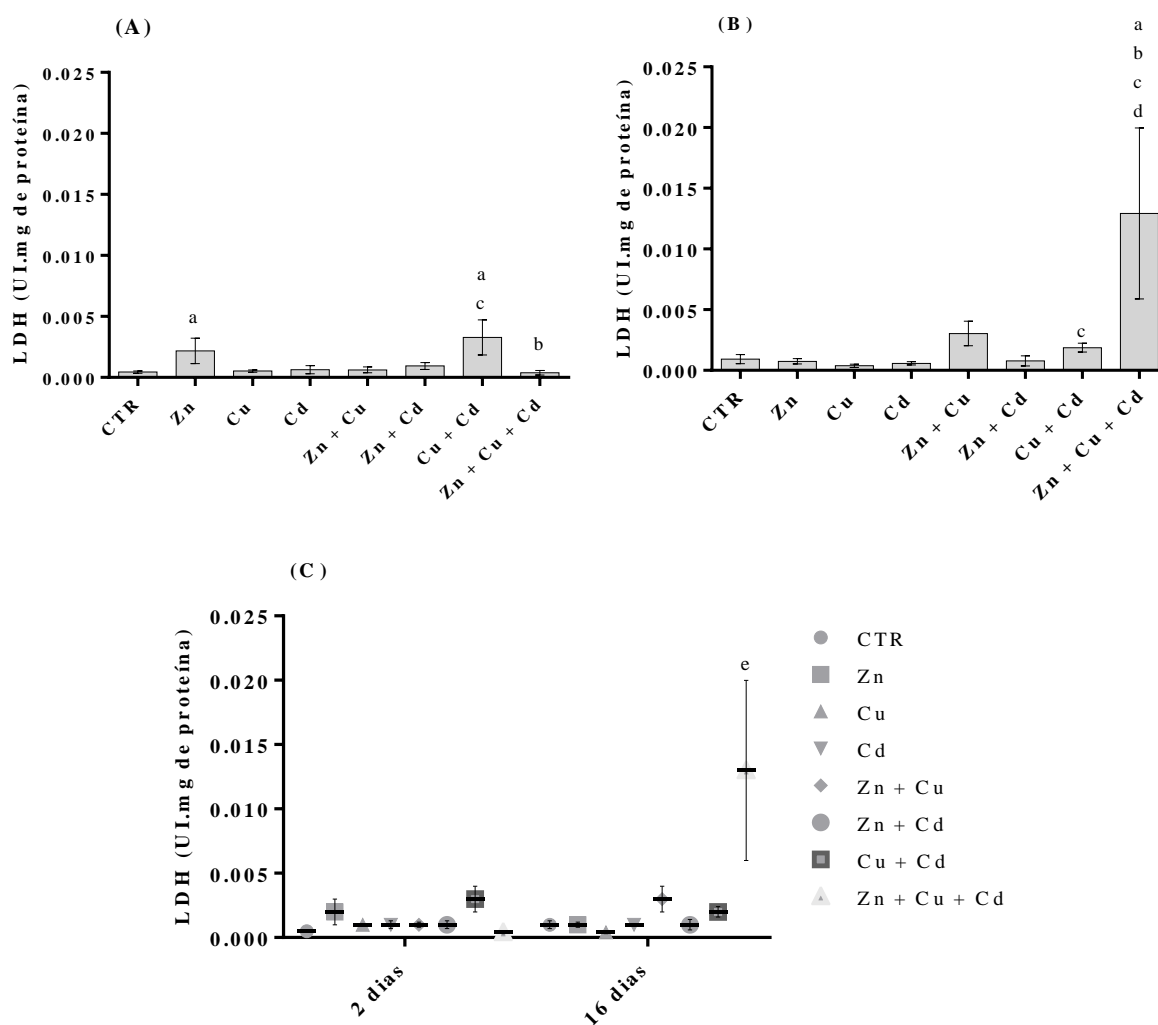
5.1. LDH

A atividade da LDH é apresentada nas figuras 11, 12 e 13. O rim apresentou maior atividade dessa enzima do que o músculo e fígado, após as duas exposições.

A atividade da LDH no fígado após a exposição por 2 dias foi maior no grupo Zn ($0,002 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) e no grupo Cu+Cd ($0,003 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) em relação ao grupo CTR ($0,0005 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína). No grupo Cu+Cd ($0,003 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) ocorreu um aumento em relação ao grupo Cu ($0,001 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína) e no grupo Zn+Cu+Cd ($0,0004 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína) ocorreu uma diminuição (Figura 11A). Após a exposição por 16 dias a LDH do grupo exposto ao Zn+Cu+Cd ($0,013 \pm 0,007$ UI.mg de proteína) foi maior em relação ao grupo CTR ($0,001 \pm 0,0003$ UI.mg de proteína) e maior que o grupo dos metais isolados (Zn $0,001 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína; Cu $0,0004 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína e Cd $0,001 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína), assim como o grupo Cu+Cd ($0,002 \pm 0,0004$ UI.mg de proteína) que foi maior que o grupo Cu (Figura 11B). Com relação ao tempo de exposição o único grupo que apresentou diferença na atividade da LDH foi o

exposto ao Zn+Cu+Cd ($0,0004 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,013 \pm 0,007$ UI.mg de proteína, 16 dias), com aumento em 16 dias (Figura 11C).

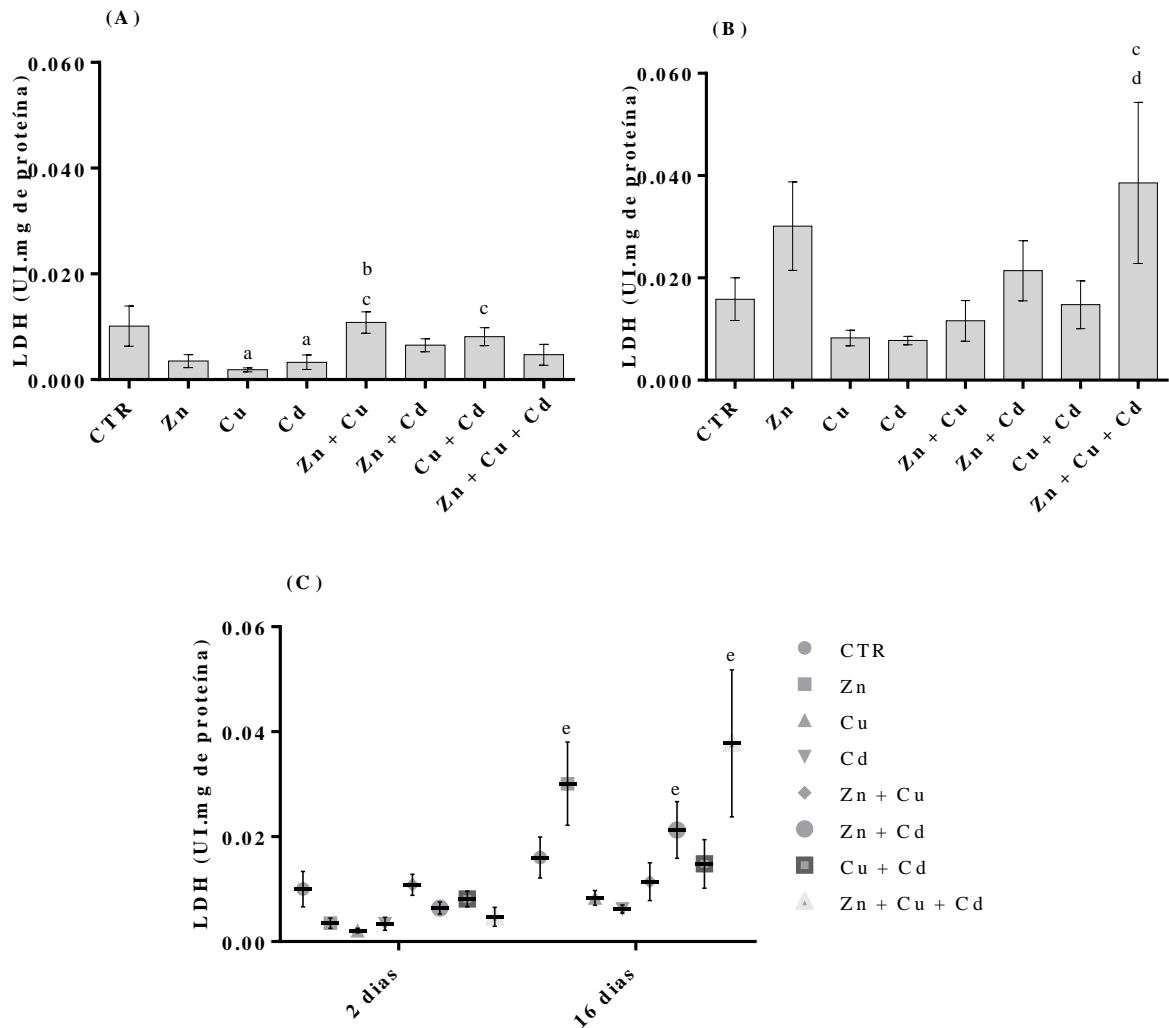
Figura 11. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



A atividade da LDH no rim após a exposição por 2 dias foi menor no grupo exposto ao Cu ($0,0021 \pm 0,0004$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,0034 \pm 0,0012$ UI.mg de proteína) em relação ao grupo CTR ($0,010 \pm 0,003$ UI.mg de proteína), assim como nos grupos Zn+Cu ($0,010 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) em relação ao grupo Zn ($0,0035 \pm 0,0009$ UI.mg de proteína) e Cu, e o grupo Cu+Cd ($0,0081 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) em relação ao grupo Cu (Figura 12A). Após a exposição por 16 dias, a atividade da enzima somente se alterou no grupo Zn+Cu ($0,011$

$\pm 0,003$ UI.mg de proteína), com aumento em relação ao grupo Cu ($0,0083 \pm 0,0014$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,0062 \pm 0,0007$ UI.mg de proteína) (Figura 12B). Já em relação ao tempo de exposição, houve aumento da atividade da LDH nos grupos Zn ($0,0035 \pm 0,0009$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,0301 \pm 0,0079$ UI.mg de proteína, 16 dias); Zn+Cd ($0,0108 \pm 0,0020$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,0213 \pm 0,0054$, 16 dias) e Zn+Cu+Cd ($0,0047 \pm 0,0018$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,0378 \pm 0,0140$ UI.mg de proteína, 16 dias) após 16 dias (Figura 12C).

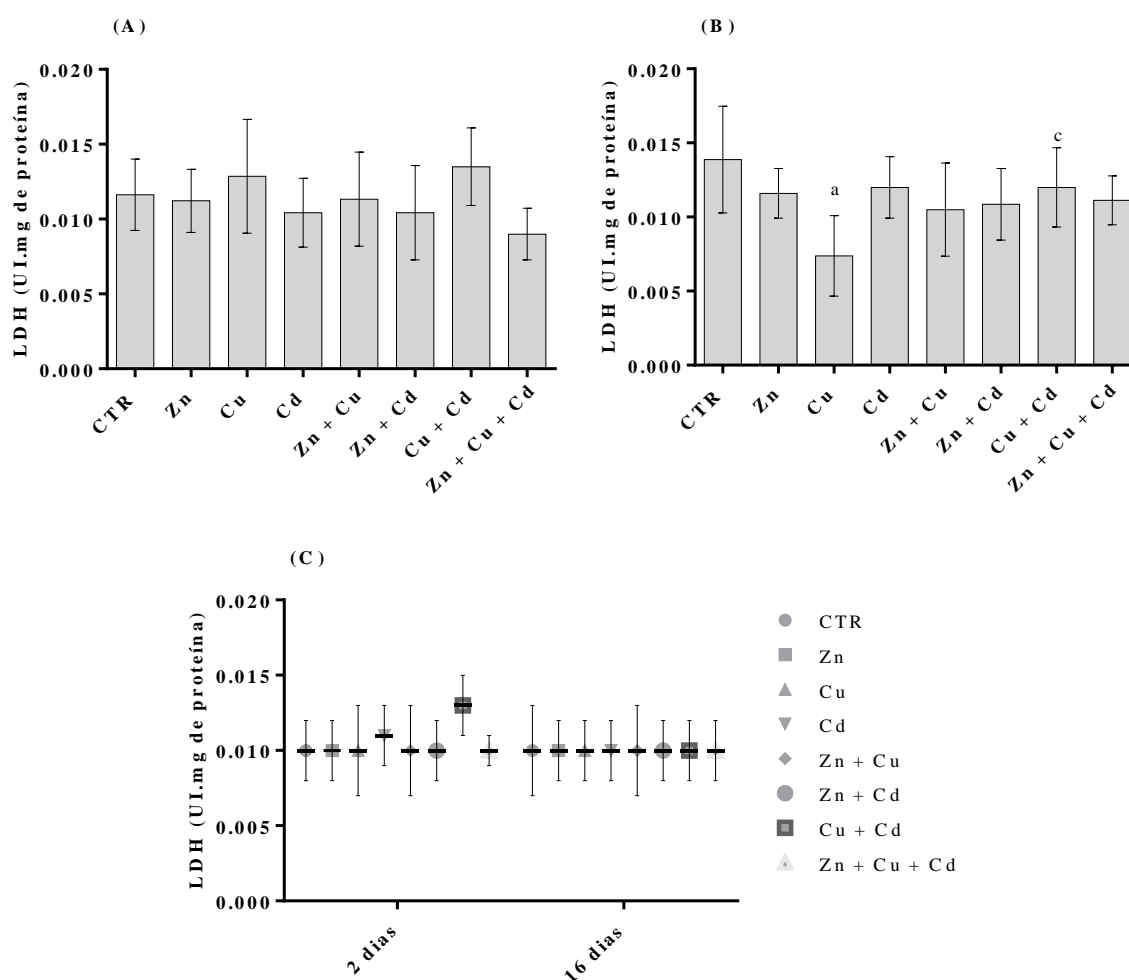
Figura 12. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



No músculo, após a exposição por 2 dias, a atividade da LDH não sofreu nenhuma alteração significativa, nem em relação ao controle, nem em relação aos metais associados ou

isolados ($p>0,05$) (Figura 13A). Enquanto que após a exposição por 16 dias a atividade da enzima diminuiu no grupo exposto ao Cu ($0,007 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) em relação ao CTR ($0,014 \pm 0,003$ UI.mg de proteína), já no grupo exposto ao Cu+Cd ($0,012 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) ocorreu um aumento na atividade enzimática em relação ao grupo Cu (Figura 13B). Em relação ao tempo de exposição, não se observou alterações significativas ($p>0,05$) (Figura 13C).

Figura 13. Atividade da LDH (UI.mg de proteína) no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p<0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

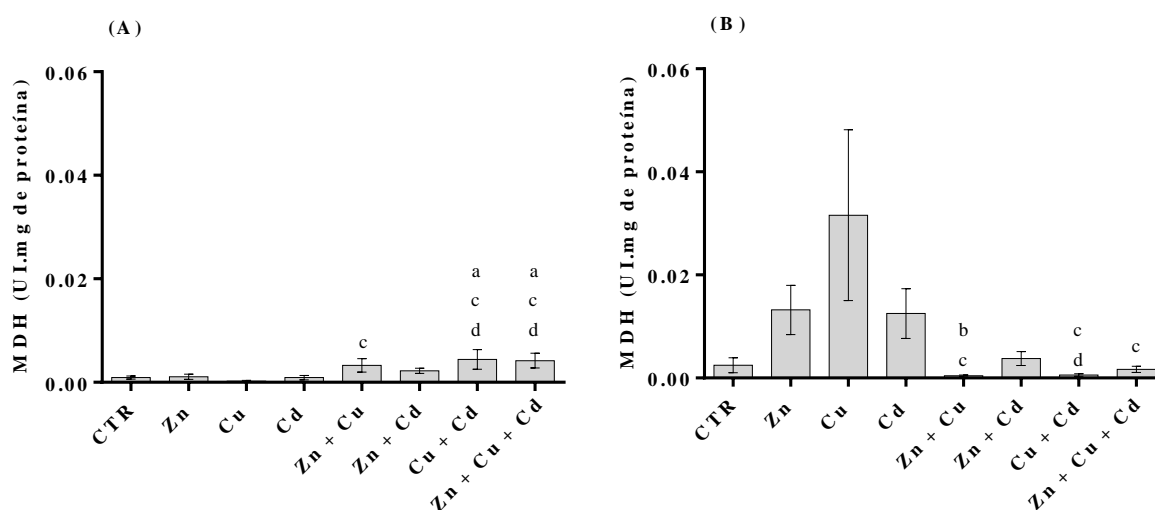


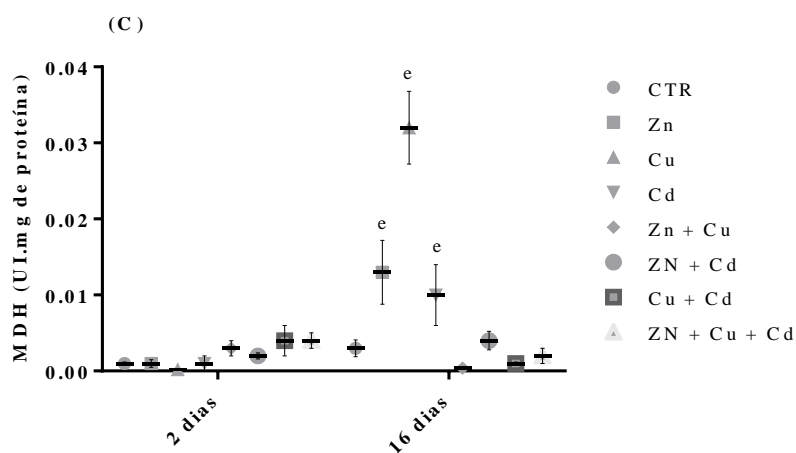
5.2.MDH

A atividade da enzima MDH é apresentada nas figuras 14, 15 e 16. O músculo apresentou maior atividade dessa enzima do que rim e do fígado, após as duas exposições.

No fígado após a exposição por 2 dias os grupos Cu+Cd ($0,004 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) e Zn+Cu+Cd ($0,004 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) apresentaram aumento na atividade da MDH em relação ao grupo CTR ($0,001 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína). Esses mesmos grupos, mais o grupo Zn+Cu ($0,003 \pm 0,001$ UI.mg de proteína), apresentaram aumento na MDH em relação aos grupos Cu ($0,0002 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,0009 \pm 0,0005$ UI.mg de proteína) (Figura 14A). Já em 16 dias a atividade enzimática da MDH diminuiu nos grupos Zn+Cu ($0,0004 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína), Cu+Cd ($0,001 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína) e Zn+Cu+Cd ($0,002 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) em relação ao Zn ($0,013 \pm 0,0042$ UI.mg de proteína), Cu ($0,032 \pm 0,0048$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,010 \pm 0,004$ UI.mg de proteína) (Figura 14B). Já em relação ao tempo de exposição houve aumento na atividade da MDH nos grupos expostos aos metais, Zn ($0,001 \pm 0,0005$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,013 \pm 0,0042$ UI.mg de proteína, 16 dias), Cu ($0,0002 \pm 0,0001$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,032 \pm 0,0048$ UI.mg de proteína, 16 dias) e Cd ($0,0009 \pm 0,0005$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,010 \pm 0,004$ UI.mg de proteína, 16 dias) após 16 dias (Figura 14C).

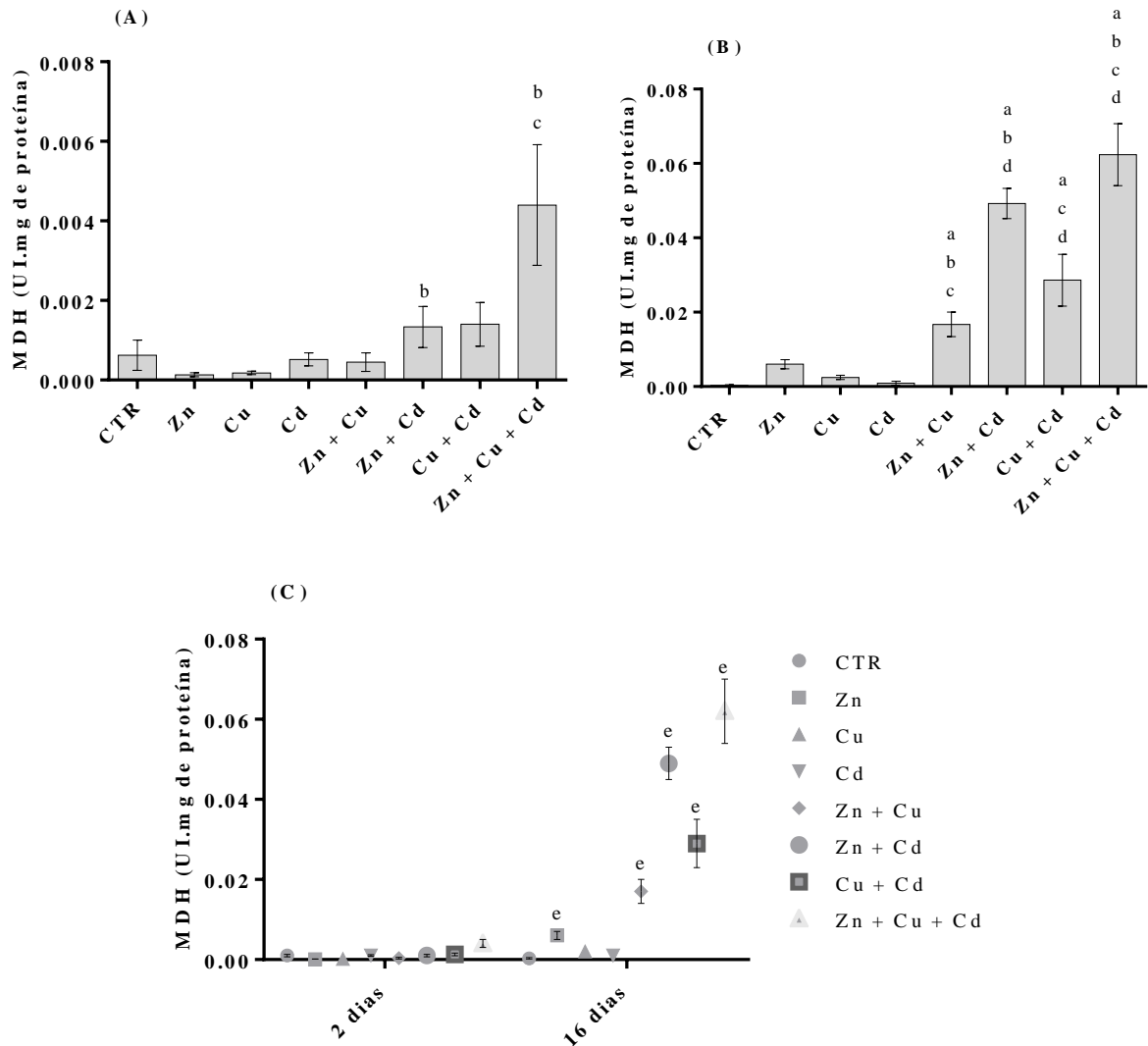
Figura 14. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.





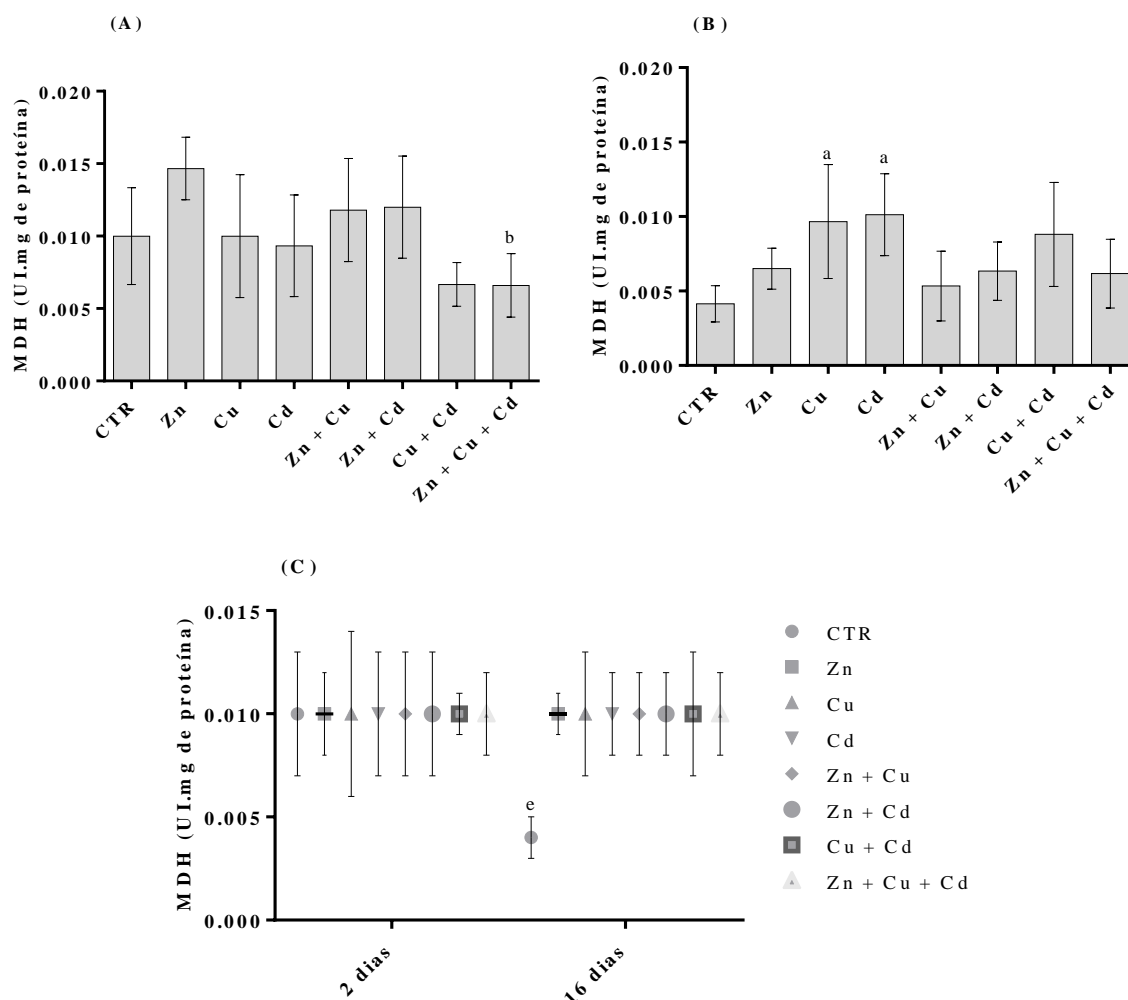
No rim, após a exposição por 2 dias, a MDH dos grupos Zn+Cd ($0,001 \pm 0,0003$ UI.mg de proteína) apresentou aumento em relação ao grupo Zn ($0,0001 \pm 0,00004$ UI.mg de proteína) isolado. O grupo exposto ao Zn+Cu+Cd ($0,004 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) apresentou aumento em relação aos grupos expostos ao Zn e ao Cu ($0,0002 \pm 0,00005$ UI.mg de proteína) (Figura 15A). Na exposição por 16 dias a MDH dos grupos Zn+Cu ($0,017 \pm 0,003$ UI.mg de proteína), Zn+Cd ($0,049 \pm 0,004$ UI.mg de proteína), Cu+Cd ($0,29 \pm 0,006$ UI.mg de proteína) e Zn+Cu+Cd ($0,062 \pm 0,008$ UI.mg de proteína) apresentaram aumento na atividade da MDH em relação ao CTR ($0,0003 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína), esses mesmos grupos apresentaram aumento em relação grupos expostos aos metais Zn ($0,006 \pm 0,001$ UI.mg de proteína), Cu ($0,002 \pm 0,0005$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,001 \pm 0,0005$ UI.mg de proteína) isolados (Figura 15B). Com relação ao tempo de exposição a atividade da MDH aumentou em 16 dias nos grupos expostos ao Zn ($0,0001 \pm 0,00004$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,006 \pm 0,001$ UI.mg de proteína, 16 dias), Zn+Cd ($0,001 \pm 0,0003$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,049 \pm 0,004$ UI.mg de proteína, 16 dias), e Zn+Cu+Cd ($0,004 \pm 0,001$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,062 \pm 0,008$, 16 dias), Zn+Cu ($0,0004 \pm 0,0002$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,017 \pm 0,003$ UI.mg de proteína, 16 dias) e Cu+Cd ($0,001 \pm 0,0003$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,029 \pm 0,006$ UI.mg de proteína, 16 dias) (Figura 15C).

Figura 15. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



No músculo, após a exposição por 2 dias, o grupo Zn+Cu+Cd ($0,006 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) a atividade da MDH diminuiu em relação ao grupo exposto ao Zn ($0,010 \pm 0,003$ UI.mg de proteína) (Figura 16A). Na exposição por 16 dias os grupos Cu ($0,010 \pm 0,003$ UI.mg de proteína) e Cd ($0,010 \pm 0,002$ UI.mg de proteína) apresentaram aumento em relação ao grupo CTR ($0,004 \pm 0,001$ UI.mg de proteína) (Figura 16B). Com relação ao tempo de exposição o grupo CTR apresentou uma diminuição na atividade enzimática da MDH em 16 dias ($0,010 \pm 0,003$ UI.mg de proteína, 2 dias vs $0,004 \pm 0,001$ UI.mg de proteína, 16 dias) (Figura 16C).

Figura 16. Atividade da MDH (UI.mg de proteína) no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição, 2 e 16 dias. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



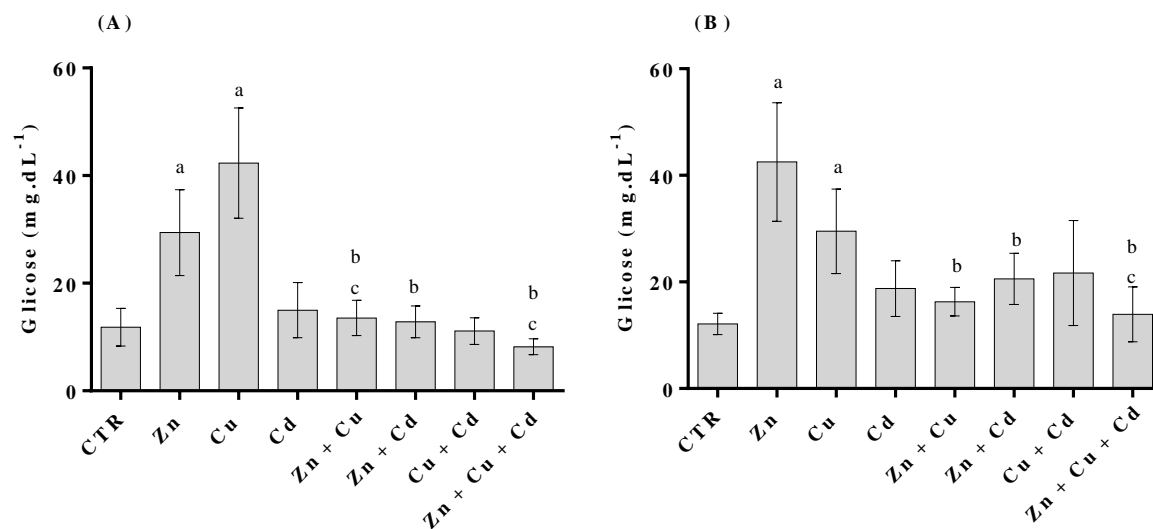
5.3. GLICOSE

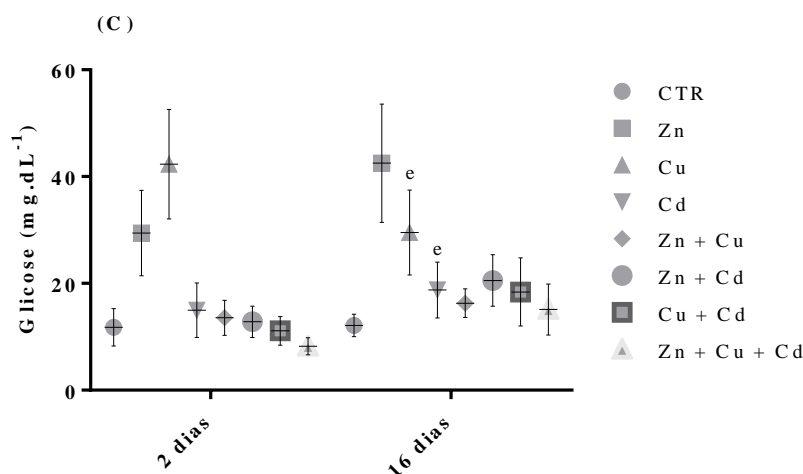
A concentração de glicose no fígado, rim e músculo é apresentada nas figuras 17, 18 e 19. O músculo apresentou maior concentração de glicose do que o fígado e rim, após as duas exposições.

As análises realizadas no fígado demonstram que após a exposição por 2 dias a concentração de glicose foi maior nos grupos expostos aos metais isolados em relação ao grupo CTR ($11,78 \pm 3,25 \text{ mg.dL}^{-1}$), Zn ($29,41 \pm 7,99 \text{ mg.dL}^{-1}$), Cu ($42,34 \pm 10,25 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Cd ($14,98 \pm 5,15 \text{ mg.dL}^{-1}$). Quando comparado os grupos isolados e combinados observou-se uma diminuição na concentração de glicose em relação aos metais isolados nos grupos Zn+Cu ($13,55 \pm 3,28 \text{ mg.dL}^{-1}$), Zn+Cd ($12,80 \pm 2,93 \text{ mg.dL}^{-1}$), Cu+Cd ($11,10 \pm 2,66 \text{ mg.dL}^{-1}$) e

Zn+Cu+Cd ($8,22 \pm 1,62 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 17A). Após a exposição por 16 dias todos os grupos expostos aos metais isolados apresentaram maior concentração de glicose em relação ao CTR (CTR $12,12 \pm 2,12 \text{ mg.dL}^{-1}$; Zn $42,51 \pm 11,09 \text{ mg.dL}^{-1}$, Cu $29,51 \pm 7,94 \text{ mg.dL}^{-1}$ e Cd $18,75 \pm 5,24 \text{ mg.dL}^{-1}$). Enquanto que os grupos combinados aos metais apresentaram diminuição significativa da glicose em relação aos metais isolados (Zn+Cu $16,29 \pm 2,67 \text{ mg.dL}^{-1}$; Zn+Cd $20,55 \pm 4,81 \text{ mg.dL}^{-1}$; Cu+Cd $18,40 \pm 6,38 \text{ mg.dL}^{-1}$ e Zn+Cu+Cd $15,11 \pm 4,76 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 17B). Em relação ao tempo de exposição os grupos expostos ao Zn ($29,41 \pm 7,99 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $42,51 \pm 1,09 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) apresentaram um aumento da glicose em 16 dias, já no grupo exposto ao Cu ($42,34 \pm 10,25 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $29,51 \pm 7,94 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) ocorreu uma diminuição na concentração de glicose (Figura 17C).

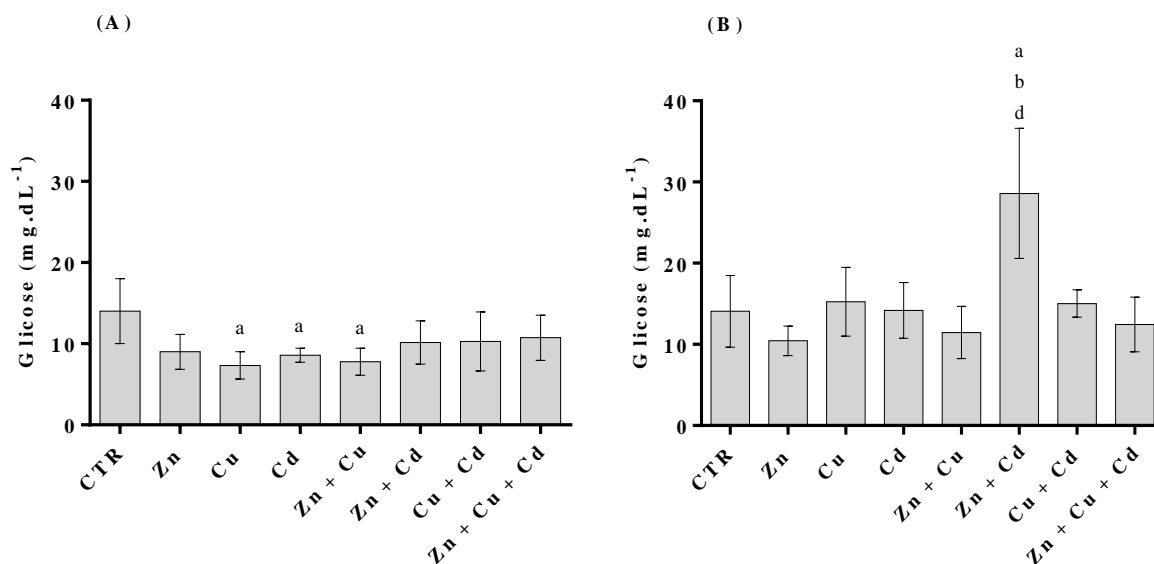
Figura 17. Concentração de glicose no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

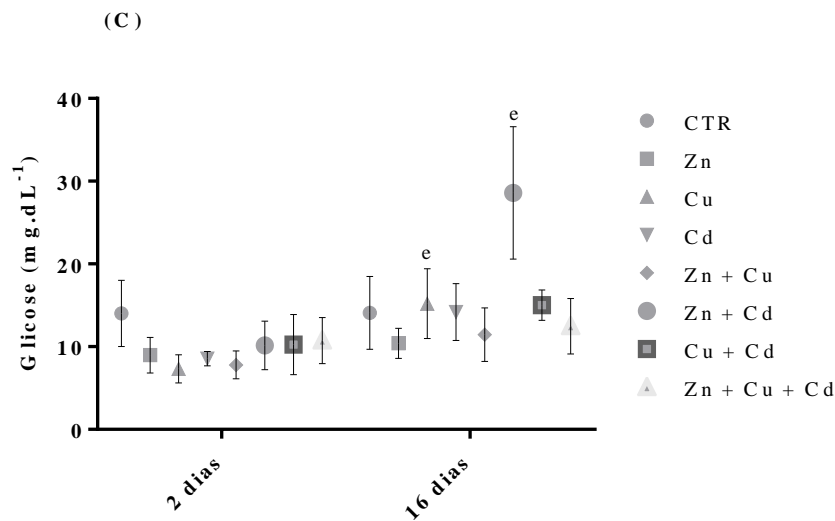




No rim após a exposição por 2 dias o grupo CTR ($14,01 \pm 3,99 \text{ mg.dL}^{-1}$) apresentou maior concentração de glicose em relação aos outros grupos, com diminuição nos grupos Cu ($7,32 \pm 1,69 \text{ mg.dL}^{-1}$); Cd ($8,55 \pm 0,87 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Zn+Cu ($7,79 \pm 1,68 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 18A). Após a exposição por 16 dias as concentrações de glicose nos grupos expostos no rim se mantiveram próximas em relação ao grupo CTR ($14,08 \pm 4,40 \text{ mg.dL}^{-1}$), com exceção do grupo Zn+Cd ($28,58 \pm 8,00 \text{ mg.dL}^{-1}$) que apresentou aumento (Figura 18B). O grupo do Cu ($7,32 \pm 1,69 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $15,20 \pm 3,43 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) apresentou um aumento na concentração de glicose em comparação ao tempo de exposição, assim como o Zn+Cd ($8,55 \pm 0,87 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $28,58 \pm 8,00 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) (Figura 18C).

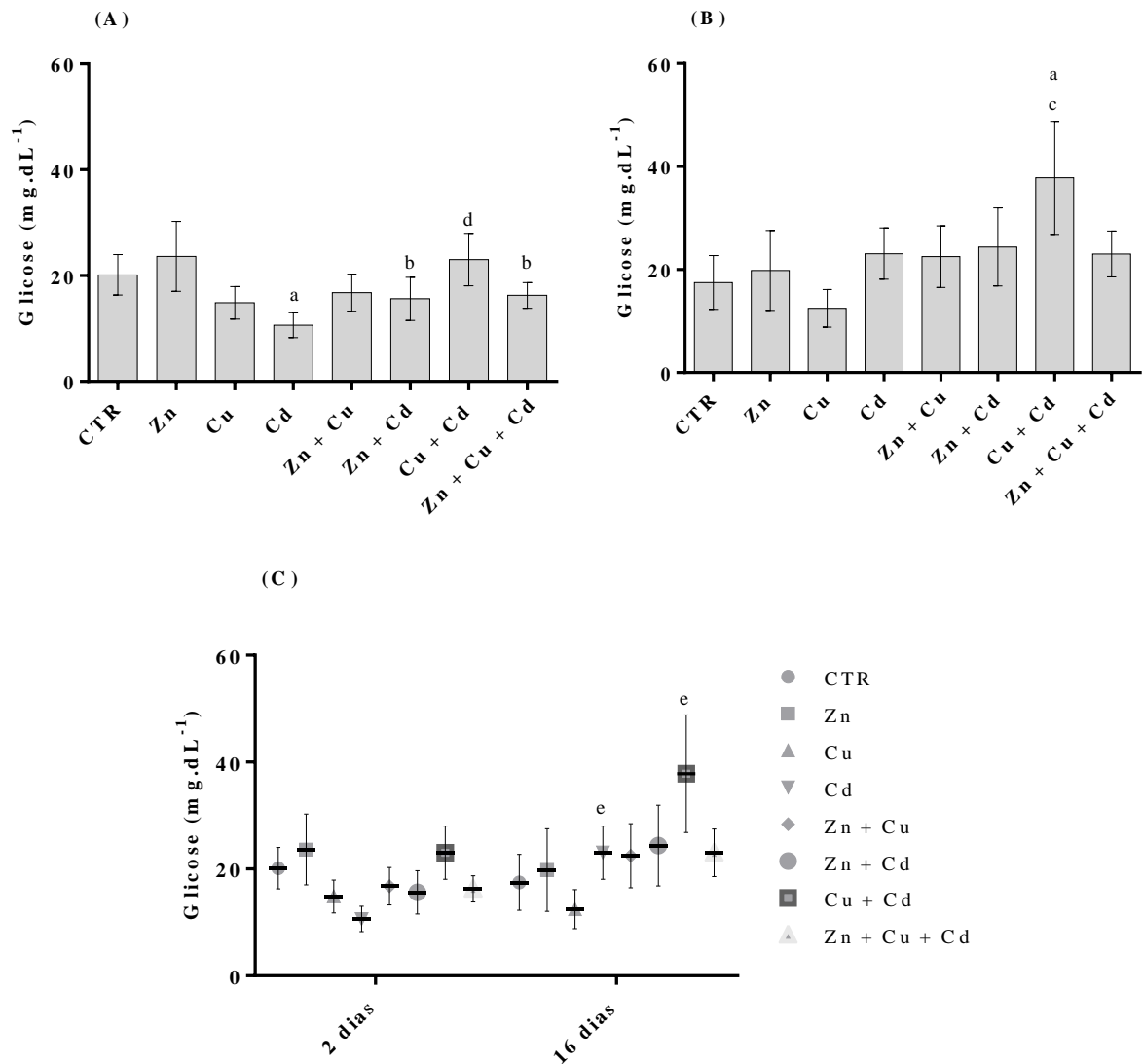
Figura 18. Concentração de glicose no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.





No músculo, após a exposição por 2 dias, pode se observar diminuição de glicose em relação ao grupo CTR ($20,14 \pm 3,86 \text{ mg.dL}^{-1}$) e o grupo exposto ao Cd ($10,65 \pm 2,36 \text{ mg.dL}^{-1}$) enquanto os outros grupos não se alteraram significativamente. Em relação aos grupos combinados e isolados, os grupos Zn+Cd ($15,60 \pm 3,50 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Zn+Cu+Cd ($16,27 \pm 2,45 \text{ mg.dL}^{-1}$) apresentaram diminuição em relação ao Zn ($23,62 \pm 6,60 \text{ mg.dL}^{-1}$) e o grupo Cu+Cd ($23,04 \pm 4,98 \text{ mg.dL}^{-1}$) aumentou em relação ao Cd ($10,65 \pm 2,36 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 19A). Após a exposição por 16 dias observou-se um aumento na concentração de glicose no grupo Cu+Cd ($37,82 \pm 10,99 \text{ mg.dL}^{-1}$) em relação ao grupo CTR ($17,48 \pm 5,23 \text{ mg.dL}^{-1}$). Com relação aos metais combinados e isolados, o grupo Cu+Cd ($37,82 \pm 10,99 \text{ mg.dL}^{-1}$) apresentou maior concentração em relação, tanto ao Cu ($12,47 \pm 3,65 \text{ mg.dL}^{-1}$), quanto ao Cd ($23,06 \pm 4,97 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 19B). A comparação entre os grupos em relação ao tempo de exposição mostrou aumento na concentração de glicose nos grupos Cd ($10,65 \pm 2,36 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $23,06 \pm 4,97 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) e Cu+Cd ($23,04 \pm 4,98 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $37,82 \pm 10,99 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) após 16 dias (Figura 19C).

Figura 19. Concentração de glicose no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



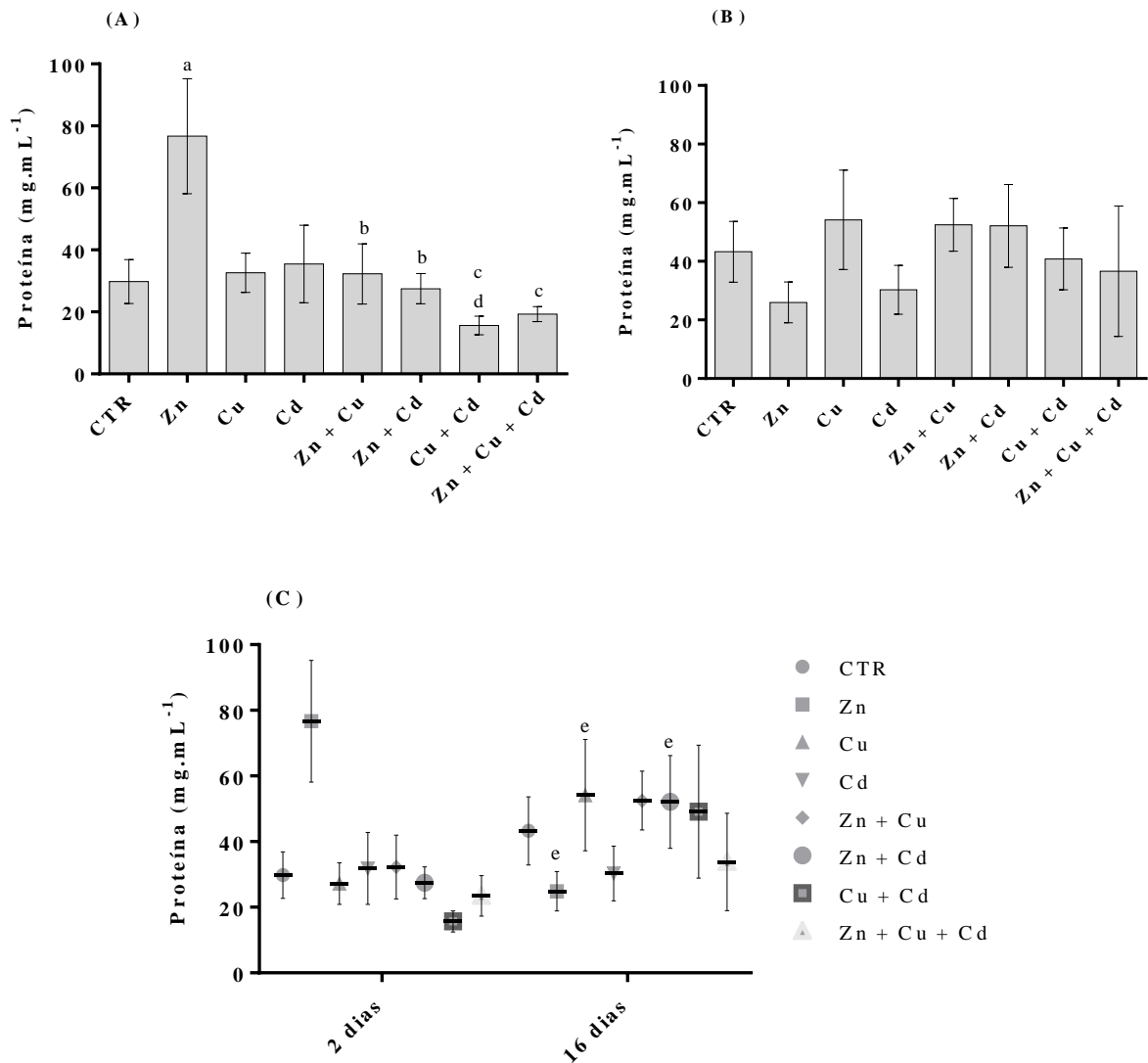
5.4. PROTEÍNAS

A concentração de proteína do fígado, rim e músculo é apresentada nas figuras 20, 21 e 22. O músculo apresentou maior concentração de proteína do que o fígado e do rim, após as duas exposições.

Após a exposição por 2 dias aos metais a concentração de proteína no fígado em relação ao grupo CTR ($35,02 \pm 10,56 \text{ mg.mL}^{-1}$) não sofreu alteração significativa, com exceção do grupo exposto ao Zn ($76,64 \pm 15,11 \text{ mg.mL}^{-1}$) que aumentou. Em relação aos grupos isolados vs combinados os grupos Zn+Cu ($35,86 \pm 15,78 \text{ mg.mL}^{-1}$); Zn+Cd ($27,47 \pm 4,86 \text{ mg.mL}^{-1}$); Cu+Cd ($15,67 \pm 3,18 \text{ mg.mL}^{-1}$) e Zn+Cu+Cd ($23,44 \pm 6,17 \text{ mg.mL}^{-1}$) apresentaram diminuição em relação ao Zn ($76,64 \pm 15,11 \text{ mg.mL}^{-1}$); Cu ($32,73 \pm 15,11 \text{ mg.mL}^{-1}$) e Cd ($36,18 \pm 17,34 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Figura 20A). Após a exposição por 16 dias a concentração de proteína não foi

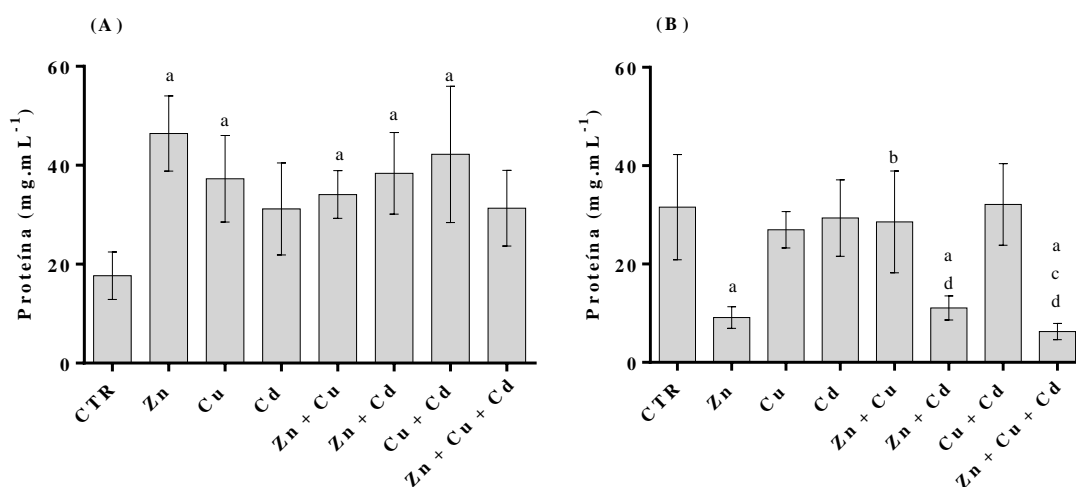
alterada em nenhum dos grupos expostos ($p > 0,05$) (Figura 20B). Com relação ao tempo de exposição a concentração de proteína no grupo exposto ao Zn ($76,67 \pm 18,53 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 dias vs $24,87 \pm 5,99 \text{ mg.mL}^{-1}$, 16 dias) apresentou uma diminuição em 16 dias enquanto os grupos Cu ($32,73 \pm 15,11 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 dias vs $59,36 \pm 22,61 \text{ mg.mL}^{-1}$, 16 dias) e Zn+Cu ($22,47 \pm 4,86 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 dias vs $57,54 \pm 22,57 \text{ mg.mL}^{-1}$, 16 dias) apresentaram aumento em 16 dias (Figura 20C).

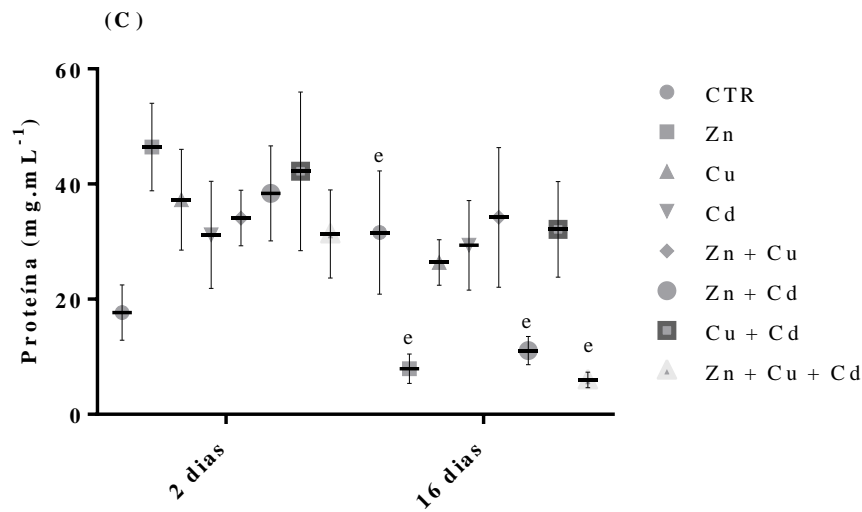
Figura 20 Concentração de proteína no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



Já no rim a concentração de proteína foi menor no grupo controle em relação a todos os grupos expostos (CTR $17,69 \pm 4,81$ mg.mL⁻¹; Zn $46,44 \pm 7,60$ mg.mL⁻¹; Cu $37,29 \pm 8,76$, Cd $31,18 \pm 9,31$ mg.mL⁻¹; Zn+Cu $34,08 \pm 4,83$ mg.mL⁻¹; Zn+Cd $38,39 \pm 8,25$ mg.mL⁻¹; Cu+Cd $42,21 \pm 13,77$ mg.mL⁻¹; Zn+Cu+Cd $31,32 \pm 7,65$ mg.mL⁻¹) (Figura 21A). Diferente do que ocorreu na exposição por 2 dias, na exposição de 16 dias o grupo CTR apresentou maior concentração de proteína em relação aos grupos expostos (CTR $31,57 \pm 10,69$ mg.mL⁻¹; Zn $7,94 \pm 2,56$ mg.mL⁻¹; Cu $26,36 \pm 3,95$ mg.mL⁻¹; Cd $29,35 \pm 7,79$ mg.mL⁻¹; Zn + Cu $34,20 \pm 12,14$ mg.mL⁻¹; Zn+Cd $11,07 \pm 2,44$ mg.mL⁻¹; Cu+Cd $32,12 \pm 8,32$ mg.mL⁻¹ e Zn+Cu+Cd $5,98 \pm 1,36$ mg.mL⁻¹) e o grupo exposto ao Zn+Cu apresentou aumento em relação ao Zn isolado, enquanto os grupos expostos ao Zn+Cd e Zn+Cu+Cd apresentaram diminuição em relação aos metais isolados (Figura 21B). Com relação ao tempo de exposição a concentração de proteína no grupo CTR ($17,69 \pm 4,81$ mg.mL⁻¹, 2 dias vs $31,57 \pm 10,69$ mg.mL⁻¹, 16 dias) aumentou, diferente do que ocorreu nos grupos Zn ($46,44 \pm 7,60$ mg.mL⁻¹, 2 dias vs $7,94 \pm 2,56$ mg.mL⁻¹, 16 dias), Zn+Cd ($38,39 \pm 8,25$ mg.mL⁻¹, 2 dias vs $11,07 \pm 2,44$ mg.mL⁻¹, 16 dias) e Zn+Cu+Cd ($31,32 \pm 7,65$ mg.mL⁻¹, 2 dias vs $5,98 \pm 1,36$ mg.mL⁻¹, 16 dias) onde se observou diminuição em 16 dias (Figura 21C).

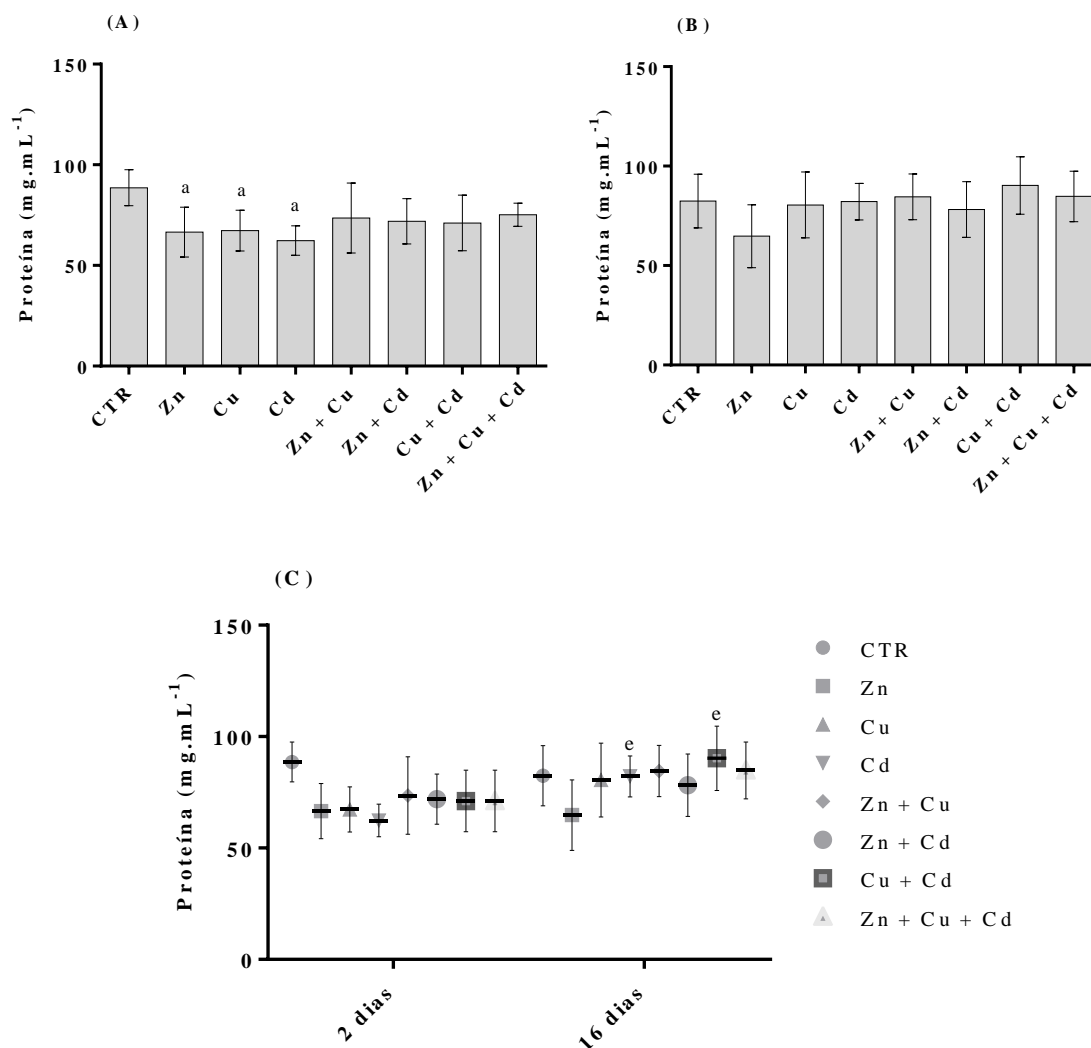
Figura 21. Concentração de proteína no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.





A concentração de proteínas no músculo apresentou diminuição em relação ao grupo CTR ($88,60 \pm 8,91 \text{ mg.mL}^{-1}$) em relação aos grupos expostos ao Zn ($66,57 \pm 12,35 \text{ mg.mL}^{-1}$), Cu ($67,28 \pm 10,12 \text{ mg.mL}^{-1}$) e Cd ($62,37 \pm 7,31 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Figura 22A). Após a exposição por 16 dias a concentração de proteína não se alterou significativamente em nenhum dos grupos ($p > 0,05$) (Figura 22B). Em relação ao tempo de exposição os grupos Cd ($62,37 \pm 7,31 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 dias vs $82,13 \pm 9,14 \text{ mg.mL}^{-1}$, 16 dias) e Cu+Cd ($71,11 \pm 13,81 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 dias vs $84,76 \pm 12,74 \text{ mg.mL}^{-1}$, 16 dias) apresentaram aumento na concentração de proteína no músculo em 16 dias (Figura 22C).

Figura 22. Concentração de proteína no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



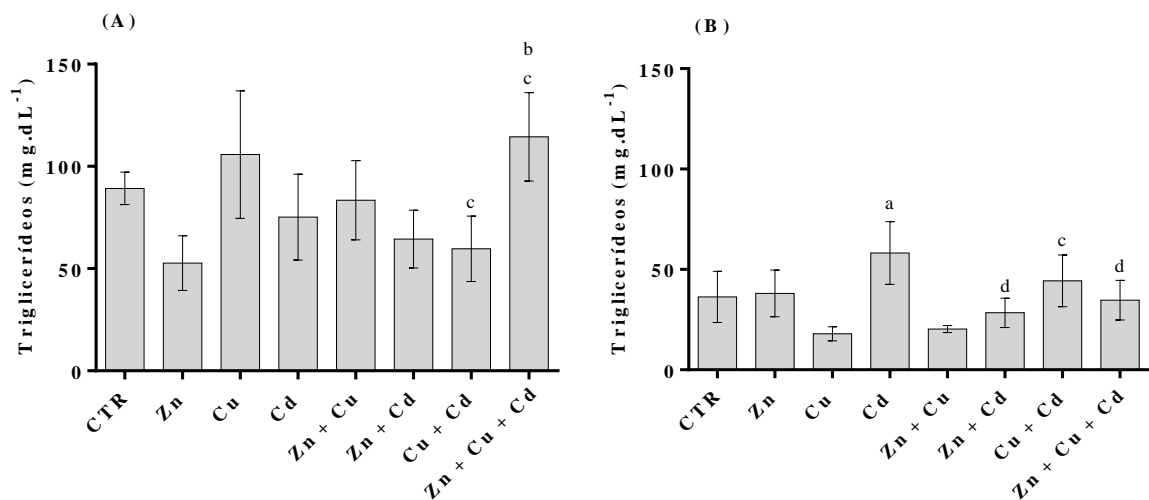
5.5. TRIGLICERÍDEOS

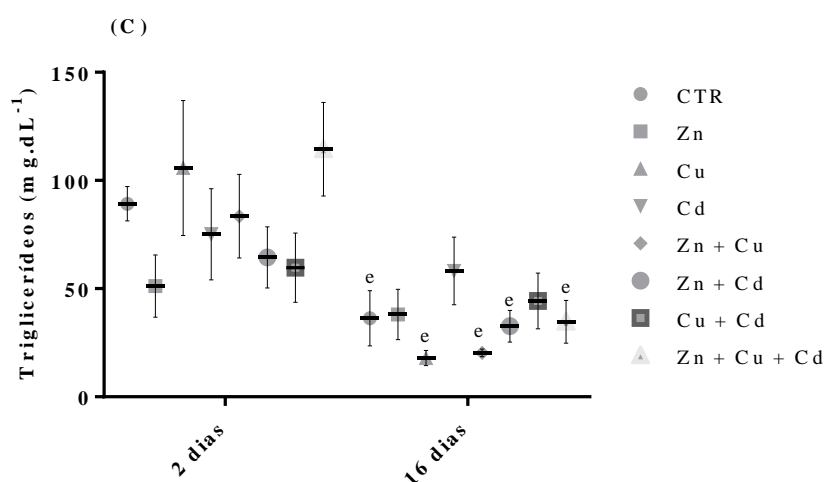
A concentração de triglicerídeos no fígado, rim e músculo é apresentada nas figuras 23, 24 e 25. O fígado apresentou maior concentração de triglicerídeos do que músculo e rim, após as duas exposições.

No fígado, após a exposição por 2 dias não houve mudanças significativas em relação ao grupo CTR e os grupos expostos, porém o grupo exposto ao Cu+Cd ($59,67 \pm 15,99$ mg.dL⁻¹) e o grupo exposto ao Zn+Cu+Cd ($114,44 \pm 21,58$ mg.dL⁻¹) apresentaram diferenças em

relação aos metais Zn ($52,70 \pm 13,38 \text{ mg.dL}^{-1}$), Cu ($105,75 \pm 31,19 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Cd ($75,15 \pm 21,05 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 23A). Após a exposição por 16 dias a concentração de triglicérides no grupo exposto ao CTR ($36,33 \pm 12,71 \text{ mg.dL}^{-1}$) foi menor que o grupo exposto ao Cd ($58,18 \pm 15,66 \text{ mg.dL}^{-1}$). E os grupos Zn+Cu ($32,64 \pm 7,33 \text{ mg.dL}^{-1}$), Cu+Cd ($44,35 \pm 12,89 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Zn+Cu+Cd ($36,61 \pm 9,84 \text{ mg.dL}^{-1}$) apresentaram diferenças significativas em relação ao Zn ($38,07 \pm 11,65 \text{ mg.dL}^{-1}$), Cu ($17,92 \pm 3,51 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Cd ($58,18 \pm 15,66 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 23B). Em relação ao tempo de exposição, os grupos CTR ($89,21 \pm 7,95 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $36,33 \pm 12,71 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias), Cu ($105,75 \pm 31,19 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $17,92 \pm 3,51 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias), Zn+Cu ($83,44 \pm 19,31 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $20,30 \pm 1,78 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias), Zn+Cd ($64,41 \pm 14,15 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $32,64 \pm 7,33 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) e Zn+Cu+Cd ($114,44 \pm 21,58 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $36,61 \pm 9,84 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) apresentaram diminuição na concentração de triglicérides em 16 dias (Figura 23C).

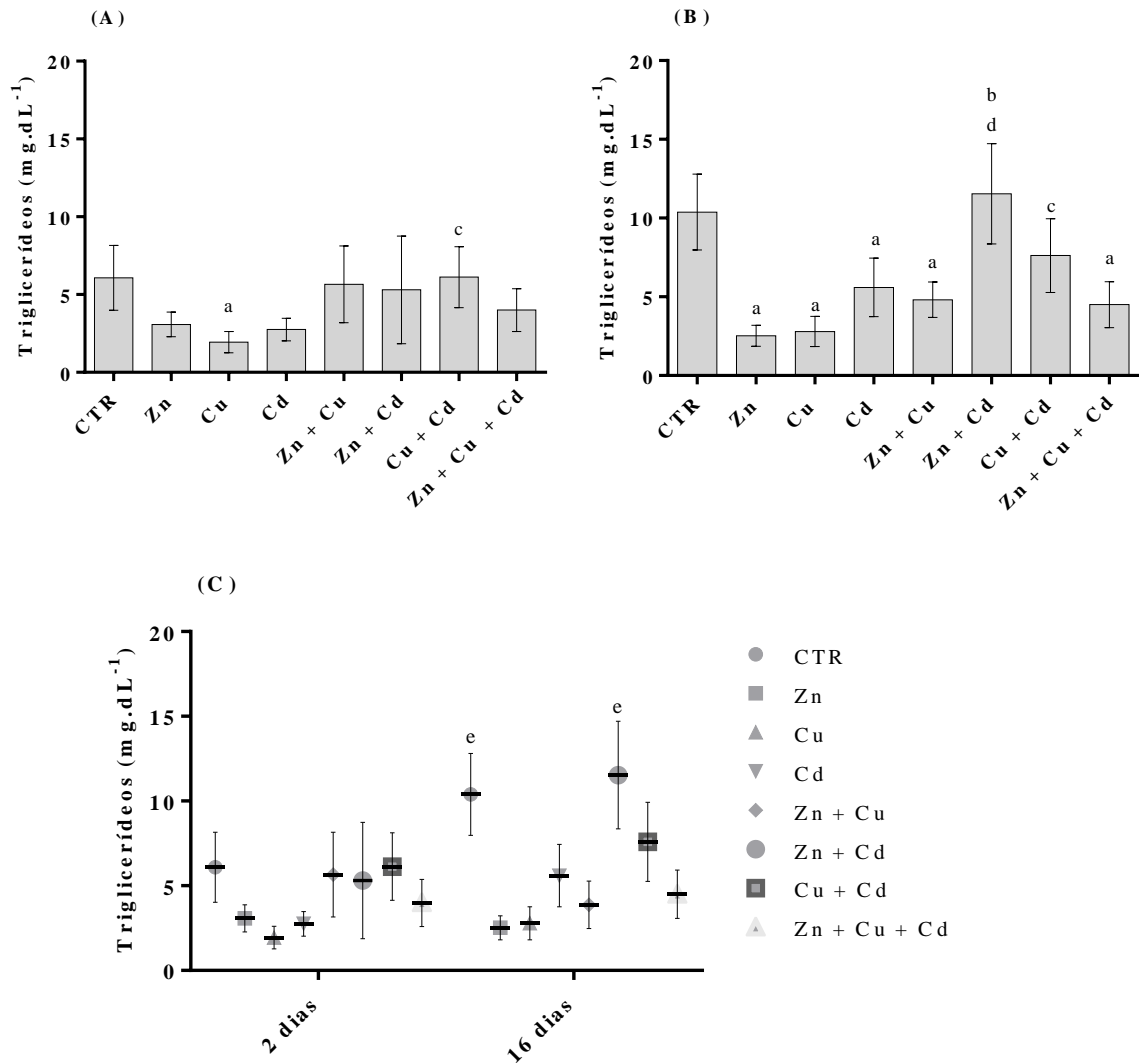
Figura 23. Concentração de triglicérides no fígado após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.





Após a exposição por 2 dias a concentração de triglicerídeos no rim diminuiu significativamente no grupo Cu ($1,94 \pm 0,67 \text{ mg.dL}^{-1}$) em relação ao CTR ($6,09 \pm 2,07 \text{ mg.dL}^{-1}$). No grupo Cu+Cd ($6,13 \pm 1,39 \text{ mg.dL}^{-1}$) a concentração de triglicerídeos aumentou em relação ao Cu ($1,94 \pm 0,67 \text{ mg.dL}^{-1}$) (Figura 24A). Após a exposição por 16 dias os grupos expostos aos metais apresentaram uma diminuição da concentração de triglicerídeos em relação ao grupo controle (CTR $10,38 \pm 2,42 \text{ mg.dL}^{-1}$; Zn $2,52 \pm 0,71 \text{ mg.dL}^{-1}$; Cu $2,79 \pm 0,98 \text{ mg.dL}^{-1}$; Cd $5,60 \pm 1,84 \text{ mg.dL}^{-1}$; Zn+Cu $4,80 \pm 1,12 \text{ mg.dL}^{-1}$; Zn+Cu+Cd $4,50 \pm 1,42 \text{ mg.dL}^{-1}$), com exceção dos grupos Zn+Cd ($11,53 \pm 3,18 \text{ mg.dL}^{-1}$) e Cd+Cu ($7,50 \pm 2,33 \text{ mg.dL}^{-1}$) que ocorreu aumento em relação aos metais Zn, Cu e Cd (Figura 24B). Já em relação ao tempo de exposição o grupo CTR ($6,09 \pm 2,07 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $10,38 \pm 2,42 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) e Zn+Cd ($5,66 \pm 2,50 \text{ mg.dL}^{-1}$, 2 dias vs $11,53 \pm 3,18 \text{ mg.dL}^{-1}$, 16 dias) apresentaram aumento na concentração de triglicerídeos em 16 dias (Figura 24C).

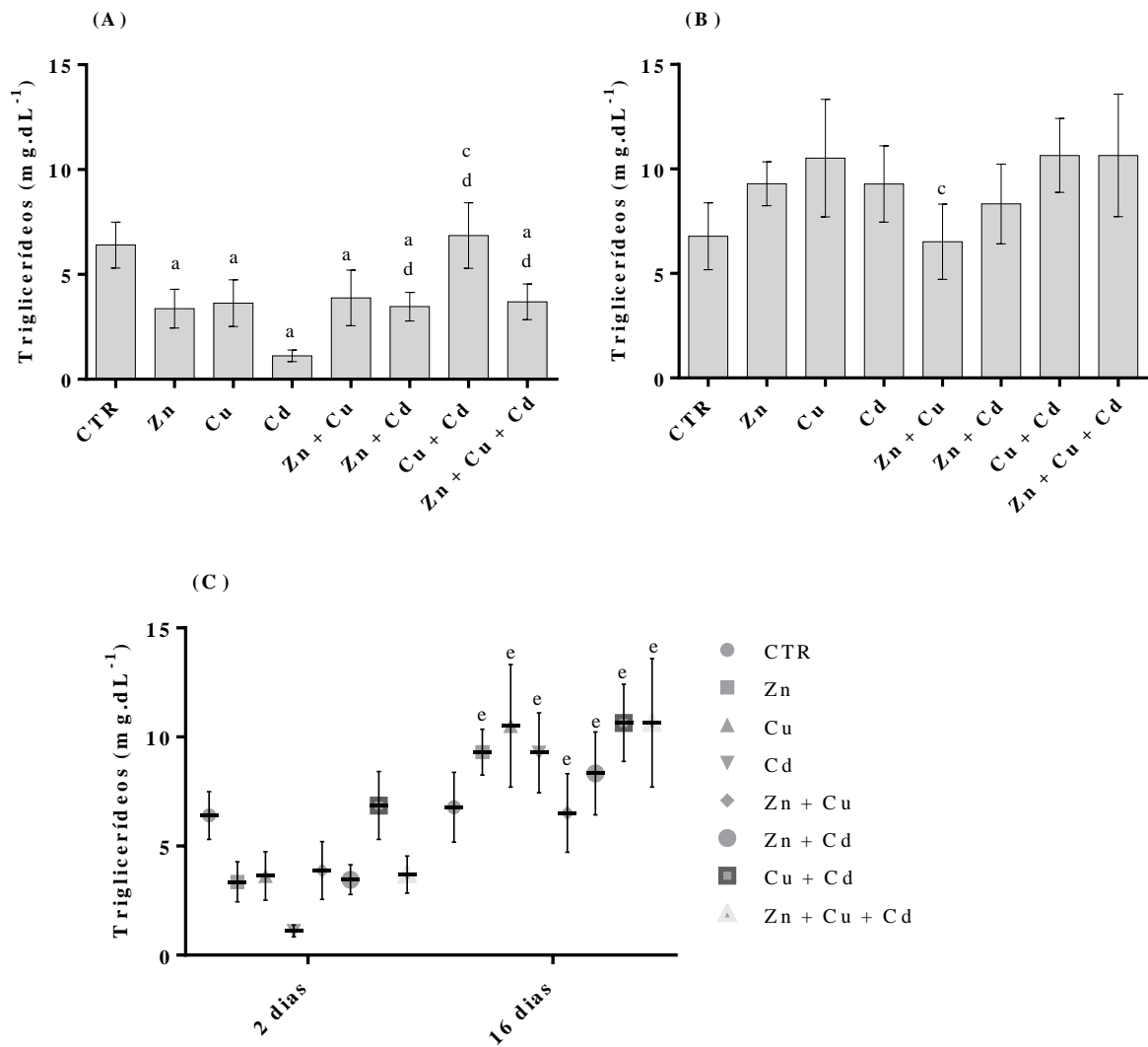
Figura 24. Concentração de triglicerídeos no rim após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



No músculo, após a exposição por 2 dias, os grupos expostos aos metais apresentaram diminuição na concentração de triglicerídeos em relação ao controle (CTR $6,40 \pm 1,09$ mg.dL⁻¹; Zn $3,36 \pm 0,92$ mg.dL⁻¹; Cu $3,36 \pm 1,11$ mg.dL⁻¹, Cd $1,11 \pm 0,27$ mg.dL⁻¹, Zn+Cu $3,88 \pm 1,32$ mg.dL⁻¹, Zn+Cd $3,46 \pm 0,68$ mg.dL⁻¹, Zn+Cu+Cd $3,69 \pm 0,85$ mg.dL⁻¹) com exceção do grupo Cu+Cd ($6,86 \pm 1,56$ mg.dL⁻¹), que junto com os grupos Zn+Cd ($3,46 \pm 0,68$ mg.dL⁻¹) e Zn+Cu+Cd ($3,69 \pm 0,85$ mg.dL⁻¹) apresentaram aumento em relação aos grupos dos metais isolados (Figura 25A). Após exposição por 16 dias ocorreu diminuição na concentração de triglicerídeos no grupo Zn+Cu ($6,52 \pm 1,80$ mg.dL⁻¹) em relação ao grupo Cu ($10,51 \pm 2,81$ mg.dL⁻¹) (Figura 25B). Com exceção do grupo CTR, todos os outros grupos apresentaram

aumento na concentração de triglicerídeos em relação ao tempo de exposição (Zn $3,36 \pm 0,92$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $9,30 \pm 1,05$ mg.dL⁻¹, 16 dias, Cu $3,36 \pm 1,11$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $10,51 \pm 2,81$ mg.dL⁻¹, 16 dias, Cd $1,11 \pm 0,27$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $9,28 \pm 1,83$ mg.dL⁻¹, 16 dias, Zn+Cu $3,88 \pm 1,32$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $6,52 \pm 1,80$ mg.dL⁻¹, 16 dias, Zn+Cd $3,46 \pm 0,68$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $8,33 \pm 1,90$ mg.dL⁻¹, 16 dias, Cd+Cu $6,86 \pm 1,56$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $10,65 \pm 1,77$ mg.dL⁻¹, 16 dias e Zn+Cu+Cd $3,69 \pm 0,85$ mg.dL⁻¹, 2 dias vs $10,65 \pm 2,94$ mg.dL⁻¹, 16 dias) em 16 dias (Figura 25C).

Figura 25. Concentração de triglicerídeos no músculo após a exposição aos metais Zn, Cu e Cd, isolados e combinados. A) Exposição por 2 dias. B) Exposição por 16 dias. C) Comparação entre o tempo de exposição. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$; ^b indica diferença significativa em relação ao metal zinco isolado. ^c indica diferença significativa em relação ao metal cobre isolado. ^d indica diferença significativa em relação ao metal cádmio isolado. ^e indica diferença significativa em relação ao tempo de exposição. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



A tabela 1 mostra um resumo de todos os resultados, comparando os três órgãos com os grupos expostos aos metais e os biomarcadores estudados.

Tabela 1. Resumo dos resultados apresentados. ▲ ▼ Indicam aumento ou diminuição em comparação com o grupo controle e ▲# ▼# indicam aumento ou diminuição entre os metais isolados e combinados.

	Grupos expostos	Fígado		Rim		Músculo	
		Tempo de Exposição					
		2 dias	16 dias	2 dias	16 dias	2 dias	16 dias
LDH	Zn	▲					
	Cu			▼			▼
	Cd			▼			
	Zn+Cu			▲#			
	Zn+Cd						
	Cu+Cd	▲▲#	▲#	▲#	▲#		▲#
	Zn+Cu+Cd	▼#	▲▲#				
MDH	Zn						
	Cu						▲
	Cd						▲
	Zn+Cu	▲#	▼#		▲▲#		
	Zn+Cd			▲#	▲▲#		
	Cu+Cd	▲▲#	▼#		▲▲#		
	Zn+Cu+Cd	▲▲#	▼#	▲#	▲▲#	▼#	
Glicose	Zn	▲	▲				
	Cu	▲	▲	▼			
	Cd			▼		▼	
	Zn+Cu	▼#	▼#	▼			
	Zn+Cd	▼#	▼#		▲▲#	▼#	
	Cu+Cd					▲#	▲▲#
	Zn+Cu+Cd	▼#	▼#			▼#	
Proteínas	Zn	▲		▲	▼	▼	
	Cu			▲		▼	
	Cd					▼	
	Zn+Cu	▼#		▲	▲#		
	Zn+Cd	▼#		▲	▼▼#		
	Cu+Cd	▼#		▲			
	Zn+Cu+Cd	▼#			▼▼#		
Triglicerídeos	Zn				▼	▼	
	Cu			▼	▼	▼	
	Cd		▲		▼	▼	
	Zn+Cu				▼	▼	▼#
	Zn+Cd		▼#		▲#	▼▲#	
	Cu+Cd	▼#	▲#	▲#	▲#	▲#	
	Zn+Cu+Cd	▲#	▼#		▼	▼▲#	

6. DISCUSSÃO

Os anfíbios, por sua facilidade de adaptação tanto em ambiente aquático como em ambiente terrestre, são ótimos bioindicadores de qualidade do ambiente (FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015). Devido a estas características são utilizados em estudos ecotoxicológicos como exposição a metais (MARCANTONIO *et al.*, 2011; RIZZI, 2014; FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015; ABDALLA *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2017).

6.1.EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS METAIS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E EXPOSTOS

O aumento ou a diminuição da atividade enzimática e as alterações nos níveis dos metabólitos servem como ótimos indicadores da condição fisiológica do organismo diante de um fator estressante (CARVALHO *et al.*, 2008; ABDEL-TAWWAB; WAFEEK, 2017).

A LDH é uma enzima importante no metabolismo dos carboidratos, convertendo reversivelmente o piruvato em lactato. Esta enzima está presente na maioria dos tecidos animais e é vital para a via glicolítica e o ciclo do ácido tricarboxílico (ou ciclo de Krebs) (NELSON; COX, 2016, p. 602). O aumento da atividade da LDH observado nos grupos Zn, Cu+Cd (2 dias) e Zn+Cu+Cd (16 dias) no fígado, foi descrito por outros autores após a exposição a diferentes metais em peixes e anfíbios (DAI *et al.*, 2009; FIRAT; KARGIN, 2010; GUNGORDU *et al.*, 2013; YENGGOKPAM *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013). Esse aumento, como descrito também em peixes por Abdel-Tawwab e Wafeek (2017), no fígado de tilápias, *Oreochromis niloticus* expostas ao Cd em diferentes temperaturas, pode indicar um aumento na atividade anaeróbia nestes organismos. Em anfíbios, o aumento da atividade enzimática da LDH pode indicar lesões nas células e tecidos (KUMARI; SINHA, 2010; MEDINA *et al.*, 2016) e também redução na oxidação de carboidratos, sugerindo que o piruvato, o produto final da glicólise, não é encaminhado para o ciclo de Krebs, mas para o ciclo do ácido láctico (THIRUMAVALAVAN, 2010). O lactado formado pode ser encaminhado para a gliconeogênese para produção de glicose (NELSON; COX, 2016, p. 574). Este resultado indica uma diminuição no metabolismo aeróbio e aumento do metabolismo anaeróbio devido a um aumento na demanda metabólica para processos de desintoxicação ou para a produção aeróbia de ATP em decorrência da exposição aos metais.

Em contraste, a diminuição da atividade da LDH nos grupos Cu e Cd (2 dias) no rim e, no músculo no grupo Cu (16 dias) pode ser devido à ação intracelular dos metais nestes órgãos. Um estudo anteriormente realizado com girinos de *L. catesbeianus* demonstrou acúmulo de Cu

no rim e músculo e acúmulo de Cd no rim após 2 e 16 dias (CARVALHO *et al.*, 2017). A LDH é uma enzima indicadora da capacidade da glicólise, portanto, o decaimento da atividade enzimática demonstra uma dificuldade na produção de energia (ALMEIDA *et al.*, 2002; ANTOGNELLI *et al.*, 2003; DAI *et al.*, 2009), logo o decaimento na atividade enzimática da LDH seria uma resposta ao acúmulo desses metais nos tecidos, como mencionado anteriormente e/ou ligação dos metais na enzima em sítios específicos. Esses resultados também mostram diminuição na produção de ATP por processos de fermentação láctica. A LDH também fornece NAD^+ para a gliceraldeído fosfato desidrogenase, enzima da via glicolítica, que desta forma mantém o funcionamento da via (NELSON; COX, 2016, p. 548).

Além disso, a LDH apresenta variações na sua forma, e estas diferentes isoformas da LDH variam de acordo com o tecido e com as condições do ambiente, visando a manutenção das suas características enzimáticas (FEIDANTSIS *et al.*, 2009; NELSON; COX, 2016, p. 602). Tais fatores podem ocasionar estresse em decorrência da incapacidade do animal em manter um estado fisiológico normal e que podem prejudicar a sua homeostase.

Em condições aeróbias, a MDH tem a função de ligação de equivalentes redutores (NADHs) produzidos na glicólise e o processamento no sistema de transporte de elétrons, além de catalisar a etapa final do ciclo de Krebs (NELSON; COX, 2016, p. 571). Neste trabalho, devido à metodologia empregada, a homogeneização dos tecidos permitiu que tanto a MDH citosólica quanto a mitocondrial estivessem disponíveis durante os ensaios. Sendo, portanto, os resultados apresentados como uma combinação da MDH dos dois compartimentos celulares (RIBEIRO *et al.*, 2015).

O aumento na atividade da MDH hepática observado nos grupos Cu+Cd e Zn+Cu+Cd (2 dias) indica uma necessidade maior de produção de ATP resultante da presença dos metais, sendo considerado um fator estressante ao animal (VERMA *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2016; GORA *et al.*, 2018), sugerindo maior taxa metabólica durante exposição aos metais combinados. Já foi demonstrado que o aumento na atividade da MDH em peixes, é uma resposta à exposição a metais no ambiente (VENUGOPAL; REDDY, 1992; LEVESQUE *et al.*, 2002). O fígado é um órgão importante, pois é o principal centro metabólico, como também é o órgão principal de desintoxicação em vertebrados (LUCIA *et al.*, 2010; THIRUMAVALAVAN, 2010). Entretanto, o aumento na atividade da MDH também foi observado nos grupos Zn+Cu, Zn+Cd, Cu+Cd e Zn+Cu+Cd no rim e nos grupos Cu e Cd no músculo em 16 dias. Esses resultados mostram que os metais combinados apresentaram maior efeito na atividade desta enzima, principalmente para o rim e o músculo, e este aumento sugere

também maior aporte energético nestes tecidos, provavelmente desviados para processos de desintoxicação.

O fígado e o rim são órgãos importantes envolvidos no metabolismo, desintoxicação e biotransformação de xenobióticos, e são altamente suscetíveis de danos mediados por metais. Nos teleósteos, os rins, além de apresentarem funções na osmorregulação, ainda atuam na síntese de hormônios e na eliminação de resíduos (SCHRECK, 2010). No caso do músculo de girinos, o processo de metamorfose pode favorecer a condição de vulnerabilidade deste órgão, uma vez que nesta fase o animal está sob estresse metabólico. De fato, Carvalho *et al.* (2017) relataram um maior acúmulo de Cu e Cd e a indução de MT no músculo de *L. catesbeianus* após exposição aos Zn, Cu e Cd. Ademais, as alterações dessas enzimas refletem ajustes metabólicos para utilização ou armazenamento de energia, como também para compensar os efeitos provocados pela presença dos metais.

O aumento da glicose plasmática indica que os organismos aquáticos estão sob estresse e que está ocorrendo mobilização energética possivelmente por liberação de catecolaminas (HEATH, 1995, p. 8; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; ROMERO, 2002; MATINEZ *et al.*, 2004; THIRUMAVALAVAN, 2010). De acordo com Barton (2002), a exposição aos metais provoca elevação dos níveis de glicose, que podem ser restabelecidos para níveis de repouso durante a recuperação do estresse em peixes. Em *L. catesbeianus*, o aumento de glicose no fígado após 2 e 16 dias nos grupos Zn e Cu indica estresse metabólico em decorrência da presença destes metais. A mesma resposta foi observada no rim no grupo Zn+Cd e no músculo no grupo Cu+Cd após exposição por 16 dias.

Embora a glicose seja um dos primeiros metabólitos a ser mobilizado em uma situação de estresse (WENDELAAR BONGA, 1997), neste estudo a glicose não foi o substrato mais utilizado por girinos de rã-touro nas condições testadas em relação ao controle.

Alguns estudos relatam o efeito dos metais nas concentrações de glicose em peixes. Almeida *et al.* (2002) observaram aumento de glicose no fígado e no músculo de *Oreochromis niloticus* após exposição a diferentes concentrações de Cd (0,35 mg.L⁻¹; 0,75 mg.L⁻¹; 1,5 mg.L⁻¹ e 3,0 mg.L⁻¹). Esses autores também verificaram maior concentração de glicose no músculo vermelho, pois é o local com maior demanda energética para o animal. Níveis aumentados de glicose no fígado e no plasma também foram encontrados em *Oreochromis niloticus* expostos ao Cd (AL-ATTAR, 2005) e em *Prochilodus lineatus* após exposição ao alumínio (CAMARGO *et al.*, 2009). Esses estudos sugerem que essa resposta está relacionada a desordens no metabolismo de carboidratos após o estresse químico e fisiológico do animal e que também está relacionada com o efeito de glicocorticóides para suprir a demanda energética causada pelo

estresse oxidativo (RANDALL; FERRY, 1992; BARCAROLLI; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; FIRAT *et al.*, 2011; STANKEVIČIŪTĖ *et al.*, 2018).

O glicogênio pode ser transformado em glicose quando necessário, principalmente se os tecidos necessitarem de energia oxidável. Neste estudo, os níveis aumentados de glicose também podem ser atribuídos à glicogenólise ou gliconeogênese hepática. A glicogenólise consiste na quebra do glicogênio armazenado no fígado e liberação de glicose para suprir a demanda energética para suprir os danos causados pelo agente estressor sob a ação do cortisol (KUMARI; SINHA, 2010; MEDINA *et al.*, 2016). A gliconeogênese é a síntese de glicose a partir de compostos não glicídicos e ocorre no fígado para satisfazer as necessidades de glicose do organismo em situações onde o carboidrato não é suficiente para manter a glicemia, nesse contexto, a glicose pode vir também a partir de outras moléculas, como da quebra de proteínas e lipídeos conforme a necessidade do organismo e da situação que ele enfrenta (NELSON; COX, 2016, p. 574). De fato, na presença de Zn houve aumento da atividade da LDH, o que corrobora com o resultado encontrado.

Em mamíferos, aminoácidos e lactato são os maiores precursores gliconeogênicos e são derivados da proteólise muscular e glicólise anaeróbia, respectivamente (MARKS *et al.*, 1996, p. 10). As proteínas também auxiliam na produção de enzimas, alguns hormônios, neurotransmissores e anticorpos, na reposição do gasto energético das células e no transporte de substâncias para o corpo e também atuam no metabolismo celular e na contração muscular (VOET, *et al.*, 2014, p. 163; NELSON; COX, 2016, p. 75).

Altos níveis de proteína podem estar presentes em tecidos que estão em rápido crescimento e desenvolvimento, para o metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de proteínas e outros processos. De fato, em girinos de *L. catesbeianus*, a maior concentração de proteínas foi observada no músculo, fígado e rim.

No fígado, foi observado aumento da concentração de proteína somente no grupo Zn após 2 dias. No rim, com exceção dos grupos Cd e Zn+Cu+Cd (2dias), todos os outros grupos apresentaram aumento na concentração de proteína, enquanto que nos grupos Zn, Zn+Cd e Zn+Cu+Cd (16 dias) a concentração de proteína diminuiu. O aumento de proteínas no rim, em situação de estresse provocada pelos metais pode implicar em maior demanda por ATP, isso pode levar a modificações no metabolismo intermediário deste órgão que serve para a síntese, a degradação e a interconversão de metabólicos importantes e também para a conservação de energia. Provavelmente, isso pode indicar um mecanismo de sobrevivência para manter constantes os nutrientes orgânicos e inorgânicos, bem como a energia química, que é derivada principalmente do ATP.

Enquanto que no músculo, a diminuição de proteína nos grupos expostos aos Zn, Cu e Cd após 2 dias sugere proteólise para liberação de aminoácidos, como a alanina, um importante substrato para a gliconeogênese, que ocorre no fígado afim de regular os níveis glicêmicos. Segundo Wendelaar Bonga (1997) os contaminantes químicos provocam uma resposta de estresse, além da resposta tóxica e esta resposta está associada à liberação do cortisol, com subsequente efeito no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos. Esses resultados mostram efeitos na concentração de proteína em combinação com os metais e com o rim e músculo como os órgãos mais sensíveis aos metais.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos a fim de analisar os efeitos que a exposição a metais causa nos principais biomarcadores, como concentração de proteína, enzimas da biotransformação, parâmetros de estresse oxidativo, e metabolismo energético, os quais foram realizados, principalmente com peixes (ALMEIDA *et al.*, 2002; VAN EL OOST *et al.*, 2003; MAES *et al.*, 2016), mas alguns também com anfíbios (MEDINA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2017). Assim, a observação de alteração na concentração de proteína nos diferentes tecidos demonstra prejuízos no metabolismo e possíveis danos celulares (estresse oxidativo) e pode ser um bom indicador de estresse em girinos de rã-touro.

O aumento de triglicerídeos está relacionado com a capacidade do xenobiótico em induzir alterações metabólicas com efeitos na membrana lipídica do animal (ONER *et al.*, 2008; LUCIA *et al.*, 2010; DE MOURA *et al.*, 2017). Essa alteração está diretamente ligada ao estresse que o animal recebe ao ser exposto a pesticidas (YOUSEF *et al.*, 2003; DE MOURA *et al.*, 2017), a efluentes industriais (SIVACHANDRAN; SULTANA 2014) e a metais (ONER *et al.*, 2008; MEDINA *et al.*, 2016). Entretanto, o fígado de girinos de *L. catesbeianus* não apresentou alteração nos triglicerídeos, apenas o grupo exposto ao Cd em 16 dias que teve um aumento.

Os animais mobilizam fontes de energia específicas para sustentar suas necessidades energéticas. Os níveis diminuídos de triglicerídeos também podem estar associados com a disponibilidade de glicose e lipídeos para a síntese desta molécula ou também ao catabolismo de triglicerídeos para disponibilizar energia para o animal. De fato, estes efeitos foram observados no rim nos grupos expostos ao Cu (2 dias) e nos grupos expostos aos Zn, Cu, Cd, Zn+Cu e Zn+Cu+Cd (16 dias), como também no músculo em todos os grupos expostos aos metais exceto no grupo Cu+Cd em 2 dias. Ademais, efeitos dos metais nas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos e que não foram determinados no presente estudo devem ser considerados (LIU *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2017). Larregle *et al.* (2008) observaram que a exposição ao

Cd desencadeava a síntese de triglicerídeos em ratos. Os autores verificaram aumento da transcrição do RNA mensageiro da glicerol-3-fosfato-acetiltransferase (mtGPAT), enzima responsável pela síntese de triglicerídeos, principalmente no fígado.

Esses resultados mostram que o metabolismo energético desempenha papel fundamental no processo de adaptação e tolerância ao estresse em girinos de rãs-touro, e a energia adicional é necessária para o enfrentamento do estresse por metais.

6.2.EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS METAIS ENTRE OS GRUPOS EXPOSTOS AOS METAIS ISOLADOS E COMBINADOS

Houve interação dos metais na atividade das enzimas LDH e MDH e nos níveis de glicose, proteína e triglicerídeos em fígado, rim e músculo de girinos de *L. catesbeianus*.

O aumento da LDH nos grupos Cu+Cd (2 e 16 dias) e Zn+Cu+Cd (16 dias) no fígado já foi descrito por alguns autores em peixes que a exposição ao Cd e o Cu podem aumentar a atividade da LDH (ALMEIDA *et al.*, 2002; FIRAT; KARGEN, 2009; ZHU *et al.*, 2013), este aumento teria sido atribuído ao estresse provocado nos animais por estes metais e devido a processos de desintoxicação (NAGARJUNA *et al.*, 2018). Outros autores verificaram acúmulo desses metais em altas concentrações no fígado, rim e músculo de girinos *L. catesbeianus* expostos às mesmas condições do nosso estudo (CARVALHO *et al.*, 2017). Um aumento também foi observado nos grupos Zn+Cu e Cu+Cd (2 dias) e Zn+Cu+Cd (16 dias) no rim, e Cu+Cd (16 dias) no músculo quando comparados com os metais isolados.

O aumento na atividade da LDH sugere que a atividade anaeróbia nestes órgãos aumentou em decorrência da co-exposição e interação dos metais a fim de compensar o maior custo energético. Concomitantemente, houve aumento da MDH no fígado (2 dias) e rim (2 e 16 dias) em quase todos os grupos dos metais combinados, indicando uma reorganização da maquinaria metabólica (maior taxa metabólica) com equilíbrio entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio. A MDH também envia malato para o citosol que pode ser oxidado a oxalacetato, sendo importante para várias vias metabólicas como a do ciclo de Krebs, gliconeogênese, síntese de aminoácidos, manutenção do balanço entre oxidação e redução como também permite a troca de metabólitos entre o citoplasma e organelas celulares (VOET, *et al.*, 2014; NELSON; COX, 2016, p. 571). Entretanto, no fígado houve diminuição da atividade da MDH após 16 dias e a redução da atividade desta enzima neste órgão pode levar a um inadequado suprimento de ATP do tecido, bem como efeito para outras vias como descrito anteriormente.

Assim, a exposição aos metais combinados pode levar ao comprometimento do sistema aeróbio (diminuição da MDH) com transição para o metabolismo anaeróbio (aumento da LDH) e progressiva insuficiência energética. Isso pode ser prejudicial, pois o fígado é um órgão essencial ao metabolismo e para processos de desintoxicação. Além disso, como já discutido anteriormente, as respostas das enzimas no fígado e no rim demonstram as diferentes sensibilidades dos tecidos. Os metais, uma vez absorvidos pelo organismo, podem reagir com uma variedade de sítios de ligação de estruturas celulares (por exemplo, as proteínas) e, então, perturbar a fisiologia normal do organismo. Ademais, o efeito tóxico dos metais no sistema enzimático depende da capacidade e disponibilidade dos tóxicos de reagir com os ligantes (MURRAY *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2017) e da interação entre eles, como a competição por determinados sítios de ligação.

Em relação ao decaimento na atividade da MDH, Venugopal e Reddy (1992) relatam que a diminuição na atividade enzimática pode ser devido à diminuição da conversão de piruvato em oxaloacetato, resultando numa diminuição do mesmo no ciclo de Krebs, que é um indicador de redução no metabolismo energético como uma resposta à exposição a xenobióticos (VENUGOPAL; REDDY, 1992; YENGGOKPAM *et al.*, 2013; GORA *et al.*, 2018). Ainda, a diminuição da atividade da MDH e consequente diminuição do funcionamento do ciclo de Krebs possivelmente por limitar o fluxo de substratos para o animal, resulta no comprometimento do processo de produção de ATP (AFSAR *et al.*, 2012).

A diminuição dos níveis de glicose, proteína (2 dias) e triglicerídeos no fígado em quase todos os grupos de metais combinados sugere um quadro de estresse provocado pelos metais. Nos girinos de rãs-touro, as concentrações alteradas de glicose nos tecidos podem levar a um esgotamento energético no animal. Já o rim mostrou aumento de proteína (2 dias) e variação dos níveis de triglicerídeos tanto para o rim (16 dias) como para o músculo (2 dias). Além disso, um alto custo de manutenção nestes tecidos, principalmente no fígado, provavelmente é mantido com a utilização dos estoques energéticos de outros tecidos, rim e músculo, ou por mudanças nas vias metabólicas (NELSON; COX, 2016, p. 941).

Esses resultados também mostram a suscetibilidade dos tecidos aos metais e que o Cd, juntamente com o Cu, apresentou maior toxicidade (Tabela 1). Para o caso dos girinos, esse quadro pode prejudicar a metamorfose do animal, comprometendo o seu desenvolvimento, pois a demanda energética do mesmo está comprometida para o processo de desintoxicação.

No caso do Zn, o principal alvo de toxicidade nos peixes é a brânquia, onde há uma interrupção na absorção do cálcio (Ca^{2+}), levando a uma hipocalcemia e eventualmente a morte do animal (HOGSTRAND, 2011, p. 149). Williams e Holdway (2000) analisaram o efeito de

diferentes concentrações de Zn (0,33; 1; 3,3; 10 e 33,33 mg L⁻¹) em diferentes estágios dos embriões do peixe *Melanotaenia fluviatilis* (3, 46 e 92h de fertilização) e observaram que quanto mais jovem o embrião, maiores são os efeitos adversos, como deformação na coluna vertebral.

Estudos descrevem que muitos processos fisiológicos podem ser afetados pela exposição crônica ao Cd, por exemplo, desenvolvimento embrionário, ionorregulação, metabolismo energético, imunidade, reprodução responsivo ao estresse (SORENSEN, 1991; USEPA, 2001). Esses impactos podem ser associados a interações diretas com o Cd, por exemplo, na Ca-ATPase, na concentração das metalotioneína MT e GSH ou indiretamente, por exemplo, pela geração de EROs. A MT diminui o impacto dos metais tanto pela ligação direta ao metal quanto pelo combate às EROs (TREVISAN, 2008; CARVALHO *et al.*, 2017), como descrito em um estudo anterior realizado com girinos de *L. catesbeianus* expostos às mesmas concentrações de metais (1 µg L⁻¹) isoladamente ou combinados (CARVALHO *et al.*, 2017).

As concentrações diminuídas de proteínas sugerem interação dos metais com estas moléculas e efeitos tóxicos, com mobilização de proteínas para desintoxicação. Essa demanda de energia pode ter efeito na atividade de enzimas e nas vias metabólicas, como já descrito anteriormente, para os processos de desintoxicação.

Nos girinos, o aumento de triglicerídeos pode indicar aumento da capacidade lipogênica e que pode ser acompanhada por uma atividade aumentada de várias enzimas relacionadas à síntese de ácidos graxos, incluindo a acetil-CoA-carboxilase (LUCIA *et al.*, 2010; DE MOURA *et al.*, 2017). Essa enzima é essencial no controle do metabolismo dos ácidos graxos (NELSON; COX, 2016, p. 940). O aumento na concentração de lipídeos nestes órgãos pode torná-los mais vulneráveis ao estresse oxidativo e a lipoperoxidação com a exposição aos metais, e assim, a análise de metabólitos e a indução de defesas antioxidantes em resposta ao estresse é importante.

O presente estudo mostrou que girinos de rãs-touro exibiram sensibilidades diferentes as co-exposições aos metais em relação aos metais isolados. Estes resultados destacam a necessidade de compreender melhor a influência do estágio de vida do organismo nas avaliações ecotoxicológicas e as interações entre os metais e sua toxicidade para os mesmos a fim de promover avaliações de risco ecológico precisas com proteção da biota.

6.3.EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS

Embora este estudo não tenha analisado a diferença entre os estágios larval e adulto de *L. catesbeianus*, a exposição aos metais por longo tempo pode prejudicar o desenvolvimento desta espécie (MEDINA *et al.*, 2016). As diferenças observadas nos diferentes parâmetros podem ser devido ao processo de metamorfose que causa estresse fisiológico (VIEIRA, 2010), entretanto, elas podem se apresentar mais acentuadas pela presença dos metais isolados e combinados.

Com relação ao tempo de exposição, o grupo exposto ao Zn+Cu+Cd no fígado apresentou aumento na atividade da LDH, sendo uma resposta à exposição aos metais e ao acúmulo dos mesmos, como anteriormente descritos e nessas mesmas condições (CARVALHO *et al.*, 2017). O mesmo foi observado nos grupos Zn, Zn+Cu e Zn+Cu+Cd no rim. Aqui também, como descrito anteriormente, essa resposta se deve a relação entre estes dois órgãos. Uma vez que um composto é excretado diretamente na bile para desintoxicação contínua, ele entra no intestino delgado e é reabsorvido no intestino ou eliminado pelas fezes (BOENING, 2000). Os metais sendo continuamente reabsorvidos são distribuídos aos dois principais órgãos de desintoxicação, o fígado e rim.

Em relação à MDH, houve um aumento na atividade após 16 dias de exposição nos grupos dos metais isolados no fígado, no grupo exposto ao Zn e em todos grupos dos metais combinados no rim. Esse aumento está relacionado com o aumento total de ATP, sendo uma resposta à alta demanda energética do animal para o processo de desintoxicação (NAGARJUNA *et al.*, 2018). Entretanto o grupo controle do músculo apresentou uma diminuição na atividade da MDH.

Com relação ao tempo de exposição, os níveis de glicose no grupo exposto ao Cd no fígado apresentaram uma diminuição após 16 dias de exposição. Já o grupo exposto ao Cu apresentou um aumento, assim como nos grupos Cu e Zn+Cd no rim e Cd e Cu+Cd no músculo. Apesar de os animais estarem vulneráveis pela presença dos metais, observa-se que os níveis de glicose apresentaram pouco efeito na demanda energética em girinos.

A diminuição da proteína no fígado (Zn) e no rim (Zn, Zn+Cd e Zn+Cu+Cd) e aumento no fígado (Cu, Zn+Cd) e músculo (Cd e Cu+Cd) em 16 dias de exposição demonstra efeitos diferentes dos metais, isolados e combinados no rim, principalmente, enquanto que no músculo o efeito maior foi do Cu e do Cd. Este aumento indica mobilização de proteínas que pode ser tanto utilizado para manutenção do aporte energético como para síntese de proteínas/enzimas em processos de desintoxicação ou metamorfose nos girinos expostos por longo tempo.

Zhu *et al.* (2011) analisaram o índice de mortalidade no peixe *Gobiocypris rarus* nos estágios larval e embrionário e os animais foram mais sensíveis na fase larval após a exposição

ao Zn, Cu e Cd e que essa sensibilidade depende do tempo de exposição aos metais. Os autores concluíram também que o Cu causou maior toxicidade ao *G. rarus* e que o mesmo potencializou os efeitos letais do Zn e Cd para as larvas recém eclodidas.

Sfakianakis *et al.* (2015) fizeram uma revisão bibliográfica que mostra uma relação entre a exposição a metais e deformações em peixes. Sassi *et al.* (2010) relacionavam a deformação do animal com a perturbação no balanço de cálcio causada pela exposição ao Cd no tecido ósseo celular de *Gambusia affinis*, levando o animal à hipocalcemia, resultando em uma coluna vertebral mais frágil e suscetível a deformidades. Couture e Kumar (2003) apontam que a diminuição no crescimento dos peixes pode ser o resultado das alterações metabólicas, mais precisamente da inibição da atividade enzimática mitocondrial e do metabolismo oxidativo, causadas pela intoxicação por Cu e Cd.

Teixeira *et al.* (2012) verificaram aumento nos níveis do cortisol no quarto e oitavo dia com retorno aos níveis basais ao final do experimento, em 12 dias, porém não notaram alteração nos níveis de glicose em girinos de *L. catesbeianus* após estresse de densidade e hipóxia. Estes autores relatam que os glicocorticóides em anfíbios apresentam um padrão específico para espécies distintas, especialmente nos estágios de pré-metamorfose e pró-metamorfose. De acordo com Belden *et al.* (2003) e Crespi e Denver (2005), a síntese de corticosteróides varia dependendo do desafio apresentado, isto é, do estímulo estressor e do ciclo de vida do organismo.

As vias metabólicas que influenciam o conteúdo hepático de gordura englobam a síntese (formação de triglicerídeos) e utilização de lipídeos. Em fígado de girinos de rã-touro houve diminuição de triglicerídeos nos grupos CTR, Cu, Zn+Cu, Zn+Cd e Zn+Cu+Cd em 16 dias e nos grupos CTR e Zn+Cd no rim, sugerindo que a atividade anaeróbia aumentou nos girinos expostos aos metais combinados em decorrência de um maior tempo de exposição a fim de compensar o maior custo energético além da metamorfose do animal. O catabolismo de triglicerídeos envolve a produção de acetil CoA que poderá ser utilizada no ciclo de Krebs, então esta diminuição de triglicerídeos pode ser acompanhada de aumento de enzimas desta via, como pode ser comprovado pelo aumento da atividade da MDH no rim (NELSON; COX, 2016, p. 574).

O aumento significativo na concentração de triglicerídeos no músculo, em todos os grupos expostos, pode ser atribuído ao aumento na expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de triglicerídeos induzido pela exposição ao Cd, assim como descrito por Pierron *et al.* (2007), sendo uma resposta ao aumento na necessidade de energia do animal. E ainda, no caso do músculo esse aumento pode estar associado ao processo de metamorfose no qual o

desenvolvimento do animal envolve reorganização muscular. (DAVIS, 2009; CARVALHO *et al.*, 2017).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos após a exposição dos girinos de rã-touro *L. catesbeianus* por 2 e 16 dias aos metais Zn, Cu e Cd demonstram que tanto a exposição aos metais isolados, quanto a exposição aos mesmos combinados, causam alterações nas principais vias metabólicas do animal. Esses resultados também puderam ser observados quando comparados os tempos de exposição.

A presença dos metais combinados provocou mudanças no metabolismo e que levaram a ajustes nas atividades da LDH e MDH e, como consequência, nos metabolitos. As atividades destas enzimas podem ser utilizadas como referência para estimar a capacidade anaeróbia e aeróbia visando a produção de ATP em resposta a exposição aos metais. É importante notar que as alterações fisiológicas consomem energia e, a partir do momento em que esses estímulos se tornam crônicos, podem ocorrer os efeitos terciários do estresse, ou seja, uma diminuição na resistência e problemas relacionados ao crescimento e desenvolvimento desses animais. Estes efeitos nos girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* são importantes para possíveis estudos sobre os animais em seu habitat natural, que estão suscetíveis a exposição por diversos xenobióticos. Nesse estudo o fígado foi o órgão mais afetado pela exposição aos metais principalmente quando combinado a outros metais. Uma vez que o fígado é o órgão alvo para os xenobióticos, pois reflete suas principais ações no metabolismo energético e na desintoxicação, os girinos podem estar mais suscetíveis às ações dos metais, o que pode comprometer a função deste órgão. Entretanto, o rim e o músculo também se mostraram órgãos importantes neste estudo, com respostas significativas indicando uma reorganização dos metabolitos diante de uma alteração no ambiente e/ou na presença de metais.

8. CONCLUSÃO

A presença dos metais provocou efeito tóxico nos órgãos estudados nesse trabalho, assim como provocou alterações nas reservas energéticas para o processo de desintoxicação dos mesmos. Os biomarcadores utilizados nesse estudo para a avaliação do efeito da exposição aos metais Zn, Cu e Cd em girinos de rã-touro evidenciaram alterações bioquímicas, indicando uma resposta do organismo. Os metais podem produzir efeitos que provocam um conjunto coordenado de respostas fisiológicas adaptativas para a sua eliminação. Ademais, essas respostas podem causar alterações morfológicas, o que pode vir a ser um problema futuro para o desenvolvimento da metamorfose desse animal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. C.; DE ANDRADE, F.L.N.; COSTA, M.J.; SALLAR, R.F. Efeito do cádmio no fígado de girinos de rã-touro. **Revista Eletrônica Científica da Uergs**, v. 3, n. 2, p.447-471, 2017

ABDEL-TAWWAB, M.; WAFEEK, M. Fluctuations in water temperature affected waterborne cadmium toxicity: Hematology, anaerobic glucose pathway, and oxidative stress status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 477, p. 106-111, 2017.

ADAMS, S. M., Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. [Formerly used by DOE/TIC for titles for which valid CODEN was not available. Now invalid] 92-DEC-15;(Country unknown/Code not available), v. 8, 1990.

AFONSO, L.G.; CARVALHO, R.; DOS SANTOS, F.M.; COELHO, A.C.B.; DE MAGALHÕES, A.B. Reprodução da exótica rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia, Anura, Ranidae) em riachos de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil. **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 85-91, 2010.

AFSAR, S.; TAMLOORKAR, H.L.; YASMEEN, R. Malate dehydrogenase activity post exposure recovery from lead intoxicated freshwater fish *Anabas testudineus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v.3, p.118-121, 2012.

AL-ATTAR, A.M. Biochemical effects of short-term cadmium exposure on the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. **J. biol. Sci**, v. 5, n. 3, p. 260-265, 2005.

ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F. G.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, n. 8, p. 673-679, 2002.

ALMEIDA, M.E., OLIVEIRA BATISTA, M. T., FEIJÓ DE OLIVEIRA, M., SREE VANI, G., RODRIGUES, E., KAWAGOE SUDA, C. N. Atividade da malato desidrogenase muscular de *Astyanax bimaculatus* da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadora de impacto ambiental. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, 2016.

ALVES, F. C.; BRANCO, A.; LUCAS, E.M. Ocorrência da espécie exótica *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) em ambientes naturais nos municípios de Chapecó e Guatambu, Santa Catarina, Brasil. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 5, n. 1/2, p. 35-42, 2008.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

AMPHIBIA WEB. Science Zone of The Dasa. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org/> > Acesso em: 07/02/2019.

ANTOGNELLI, C., ROMANI, R., BALDRACCHINI, F., DE SANTIS, A., ANDREANI, G., TALESA, V. Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-biological interactions**, v. 142, n. 3, p. 297-305, 2003.

ASTM - American Society for Testing and Materials. 2000. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96). In: Annual Book of Standards, v. 11.05, Section 11. pp. 220-240. Philadelphia, PA.

AVMA - American Veterinary Medical Association, 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of American Veterinary Society** 218, 669-696.

BAKER, J. R.; SATARUG, S.; EDWARDS, R. J.; MOORE, M. R.; WILLIAMS, D. J.; REILLY, P. E. Potential for early involvement of CYP isoforms in aspects of human cadmium toxicity. **Toxicology letters**, v. 137, n. 1, p. 85-93, 2003.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 72, n. 3, p. 639-646, 2004.

BARTON, B.A., Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Conservation Biology**, v.125, n.3, p.271- 285, 2005.

BELDEN L.K.; MOORE I.T.; MASON R.T.; WINGFIELD J.C.; BLAUSTEIN A.R. Survival, the hormonal stress response and UV-B avoidance in Cascades Frog tadpoles (*Rana cascadae*) exposed to UV-B radiation. **Functional Ecology**, v. 17, n. 3, p. 409-416, 2003.

BILA, D.M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BLAUSTEIN, A.R.; HAN, B. A.; RELYEA, R. A.; JOHNSON, P. T.; BUCK, J. C.; GERVASI, S. S.; KATS, L. B. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 108-119, 2011.

BOENING, Dean W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1335-1351, 2000.

BOONE, M.D.; SEMLITSCH, R. D.; LITTLE, E. E.; DOYLE, M. C. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. **Ecological Applications**, v. 17, n. 1, p. 291-301, 2007.

BRADFORD, M.M. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, v. 72: p. 248-254. 1976.

BRASIL, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm>. Acesso em: 20 Ago. 2018.

BRODEUR, J. C.; CANDIOTI, J. Vera. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: Potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa region of Argentina. In: **Ecotoxicology and Genotoxicology**. 2017. p. 163-194.

CAMARGO, M.M.P; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 40-46, 2009.

CAMPANHA, M.C.; AWAN, A.T.; DE SOUZA, D.N.; GROSSELI, G.M.; MOZETO, A.A.; FADINI, P.S. A 3- year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of Sao Paulo State of Southeast Brazil. **Environ Sci. Pollut Res. Int.** 22 (10), 7936-7947, 2015.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Arthmed, 2004. 752p

CARVALHO, C.S., FERNANDES, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular; Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 437-442, 2008.

CARVALHO, C. S.; UTSUNOMIYA, H. S. M.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; COSTA, M. J.; FERNANDES, M. N. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 445-452, 2017

CASTRO, I.B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incurstantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CATENAZZI, A. State of the world's amphibians. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, p. 91-119, 2015.

CERICATO, L.; MACHADO N.J.G., KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L.J.G. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology ; Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 363-367, 2009.

CHEN, Q. L.; GONG, Y.; LUO, Z.; ZHENG, J. L.; ZHU, Q. L. Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquatic toxicology**, v. 142, p. 380-386, 2013.

CHEN, Q. L.; LUO, Z.; LIU, X.; SONG, Y. F.; LIU, C. X.; ZHENG, J. L.; ZHAO, Y. H. Effects of waterborne chronic copper exposure on hepatic lipid metabolism and metal-element composition in *Synechogobius hasta*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 2, p. 301-315, 2013.

CHIBA, W.A.C., PASSERINI, M.D., BAILO, J.A.F., TORRES, J.C., TUNDISI, J.G. Seasonal study of contamination by metal in water and sediment in a sub-basin in the Southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 4, p. 833-843, 2011.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G.N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273-283, 1979.

COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of aquatic organisms**, v. 92, n. 2-3, p. 93-99, 2010.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Ministério do Meio Ambiente, Resolução No357, de 17 de marco de 2005. p. 1-23.

CONCEIÇÃO, F.T., SARDINHA, D.S., GODOY, L.H., FERNANDES, A.M., PEDRAZZI, F.J.M. Influência sazonal no transporte específico de metais totais e dissolvidos nas águas fluviais da Bacia do Alto Sorocaba (SP). **Geochim. Bras.** 29 (1), 23-34, 2015.

COSTA, C. R.; OLIVI, P., BOTTA, C. M., ESPINDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COUTURE, P.; KUMAR, P.R. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 107-120, 2003.

CRESPI E.J.; DENVER R.J. Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular; Integrative Physiology**, v. 141, n. 4, p. 381-390, 2005.

CUNHA, E.R., DELARIVA, R.L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802): Uma revisão. **Revista de Saúde e Biologia**. v.4. n.2. p.34-46. Jul/dez. 2009.

DA SILVA, D.C.V.R, POMPÊO M., PAIVA T. C. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPEO, M *et al.* (Org). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2015. p. 340-353

DAI, W., FU, L., DU, H., JIN, C., XU, Z. Changes in growth performance, metabolic enzyme activities, and content of Fe, Cu, and Zn in liver and kidney of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. **Biological trace element research**, v. 128, n. 2, p. 176-183, 2009.

DAL-MEDICO, S.E., RISSOLI, R.Z., GAMERO, F.U., VICTÓRIO, J.A., SALLA, R.F., ABDALLA, F.C., SILVA-ZACARIN, E.C.M., CARVALHO, C.S., COSTA, M.J. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 104, 168-174. 2014.

DAVIS, A.K. Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 2, p. 181-186, 2009.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.

DE CARVALHO DORES, E.F.G.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso—análise preliminar. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DE JESUS, T.B.; DE CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 7, 2008.

DE MOURA, F.R.; LIMA, R.S.; CUNHA, A. P. S.; DA COSTA MARISCO, P.; AGUIAR, D. H.; SUGUI, M. M.; SINHORIN, A.P.; SINHORIN, V. D. G. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 241-248, 2017.

DE PAIVA MAGALHAES, D.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

DEGARADY, C. J.; HALBROOK, R. S. Using anurans as bioindicators of PCB contaminated streams. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 1, p. 127-130, 2006.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. **Nondestructive biomarkers in vertebrates**, p. 271-295, 1994.

DONATO, M. T.; CASTELL, J.V. Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 153-178, 2003.

EATON, D.L., GILBERT, S.G. Princípios de Toxicologia. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.06. 2012.

EROGLU, A.; DOGAN, Z.; KANAK, E. G.; ATLI, G.; CANLI, M. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229-3237, 2015.

FALFUSHYNSKA, H.; GNATYSHYNA, L.; FEDORUK, O.; MITINA, N.; ZAICHENKO, A.; STOLIAR, O.; STOIKA, R. Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog *Rana ridibunda*, **Comp. Biochem. Physiol., C** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.006>

FAUSTMAN, E.M.; OMENN, G.S. Avaliação do Risco. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.52. 2012.

FEIDANTSIS, K.; PÖRTNER, H.O.; LAZOU, A.; KOSTOGLU, B.; MICHAELIDIS, B. Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata* during long-term exposure to increasing temperatures. **Marine Biology**, v.156, p.797-809, 2009.

FELÍCIO, A. A. Efeitos bioquímicos e estrogênicos do N-(3, 4-diclorofenil)-N, Ndimetilureia (diuron) e seus metabólitos, isoladamente ou em associação com alquilfenóis em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2017. (Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/150003>>).

FENTON, H. J. H. L. XXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v.65, p. 899-910, 1894.

FIRAT, Ö.; COGUN, H. Y.; YÜZEREROĞLU, T. A.; GÖK, G.; FIRAT, Ö.; KARGIN, F.; KÖTEMEN, Y. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 657-666, 2011.

FIRAT, Ö.; KARGIN, F. Biochemical alterations induced by Zn and Cd individually or in combination in the serum of *Oreochromis niloticus*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 647-653, 2010.

FITZPATRICK, L. C. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **American Zoologist**. v. 16, n. 4, p. 725-732, 1976.

FLEMMING, C. A.; TREVORS, J. T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 44, n. 1-2, p. 143-158, 1989.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 12, p. 67-86, 2005.

FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G.T.W. Metal pollution in the aquatic environment Springer Verlag, Berlin, Heidelberg et **New York**, 2nd revised edition, 486 pp., 1983.

FRANCO-BELUSSI, L.; SKÖLD, H.N.; DE OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, p. jeb. 134973, 2016.

FREITAS, F., LUNARDI, S., SOUZA, L. B., VON DER OSTEN, J. S. C., ARRUDA, R., ANDRADE, R. L. T., BATTIROLA, L. D. Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 133-139, 2018.

FROST, D. R. GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R. H., HAAS, A., HADDAD, C. F., DE SÁ, A.C; CHANNING, M.W; STHEPEN, D.C; CHRISTOPHER J.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPEBELL, B.L.; BLOTTO, P.M.; ROBERT, D.C.; RONALD, A.N, JOHN, L.D.; DAVID, M.G.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-291, 2006.

GARCIA, P.C.A., SAWAYA, R.J., MARTINS, I.A., BRASILEIRO, C.A., VERDADE, V.K., JIM, J., SEGALLA, M.V., MARTINS, M., ROSSAFERES, D.C., HADDAD, C.F.B., TOLEDO, L.F., PRADO, C.P.A., BERNECK, B.M. & ARAÚJO, O.G.S. 2009. Anfíbios. In Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo, Vertebrados (P.M. Bressan, M.C.M. Kierulff & A.M. Sugieda, eds.). Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, p. 329-347.

GIROTTO, E.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; SANTOS, D. R. D.; SILVA, L. S. D.; LOURENZI, C. R.; LORENSINI, F.; VIEIRA, R.C.B; SCHMATZ, R. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, 2010.

GIULIO, R.T.D.; NEWMAN, M. C. Ecotoxicologia. KLAASSEN, CD; WATKINS III, JB Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull. New York: Artmed, p. 392-399, 2012.

GOLOVANOVA, I. L. Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates. **Inland Water Biol.** 1: 93-101. 2008.

GOVEIA, D.; ROCHA, J. C.; OLIVEIRA, L. C. D.; MORAIS, L. C. D.; CAMPOS, V. D.; FRACETO, L. F.; ROSA, A. H. Caracterização estrutural de substâncias húmicas aquáticas extraídas dos rios Itapanhaú e Ribeira de Iguape. **Química Nova**, p. 753-758, 2011.

GORA, A. H., SAHU, N. P., SAHOO, S., REHMAN, S., AHMAD, I., AGARWAL, D., DAR, S.A., RASOOL, S. I. Metabolic and haematological responses of *Labeo rohita* to dietary fucoidan. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 1042-1050, 2018.

GOSNER, K. L. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. **Herpetologica**. Vol. 16, No. 3 (Sep. 23, 1960), pp. 183-190, 1960.

GROSS, J.A.; CHEN, T.H.; KARASOV, W. H. Lethal and sublethal effects of chronic cadmium exposure on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1192-1197, 2007.

GUO, J.; DAI, X.; XU, W.; MA, M. Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere**, v. 72, n. 7, p. 1020-1026, 2008.

GÜNGÖRDÜ, A; BIRHANLI, A; OZMEN, M. Biochemical response to exposure to six textile dyes in early developmental stages of *Xenopus laevis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 1, p. 452-460, 2013.

HARE, Landis. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. **Critical reviews in toxicology**, v. 22, n. 5-6, p. 327-369, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical journal**, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.

HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. 2^a ed. Lewis Publishers, 357p. 1995.

HEIN, M.s. Copper deficiency anemia and nephrosis in zinc-toxicity: a case report. **South Dakota Journal of Medicine**, v. 56, n. 4, p. 143-147, 2003.

HENDERSON, R.; HOBBIE, J.; LANDRIGAN, P.; MATTISOTI, D.; PERERA, F.; PFTTAER, E.; WOGAN, G. Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 7, p. 3-9, 1987.

HERKOVITS, J; HELGUERO, L.A. Copper toxicity and copper–zinc interactions in amphibian embryos. **Science of the total environment**, v. 221, n. 1, p. 1-10, 1998.

HIGLEY, E.; TOMPSETT, A. R.; GIESY, J. P.; HECKER, M.; WISEMAN, Effects of triphenyltin on growth and development of the wood frog (*Lithobates sylvaticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 144, p. 155-161, 2013.

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 180, p. 62-65, 2002.

HODGSON, E. Nephrotoxicity. In: Hodgson, E. A Textbook of Modern Toxicology. 3 ed. Wiley Interscience. New Jersey. 2004.

HOGSTRAND, C. (2011). Zinc. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, 135–200. doi:10.1016/s1546-5098(11)31003-5

HU, W., MAI, K. S., LUO, Z., ZHENG, J. L., CHEN, Q. L., PAN, Y. X. Effect of waterborne copper on lipid metabolism in hepatopancreas and muscle of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1458-1468, 2017.

HUANG, C., CHEN, Q. L., LUO, Z., SHI, X., PAN, Y. X., SONG, Y. F., ZHUO M.K., WU, K. Time-dependent effects of waterborne copper exposure influencing hepatic lipid deposition and metabolism in javelin goby *Synechogobius hasta* and their mechanism. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 291-300, 2014

IGLESIAS, J. M. P. Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais. 2015. 73 f. Dissertação – (mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015 Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/127794>>

IYER, K.R.; SINZ, M.W. Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. **Chemico-biological Interactions**, v. 118, n. 2, p. 151-169, 1999.

IYNEDJIAN, P.B. Mammalian glucokinase and its gene. **Biochemical Journal**, v. 293, n. Pt 1, p. 1, 1993.

JAMES, S. M.; LITTLE, E. E. The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 377-380, 2003.

JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 4, p. C849-C868, 2008.

KUMAR, V., SAHU, N. P., PAL, A. K., KUMAR, S., SINHA, A. K., RANJAN, J., BARUAH, K. Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 491-499, 2010.

KUMARI, K.; SINHA, R. C. Biochemical changes in the toad, *Bufo melanostictus* as a function of methyl parathion: ascorbic acid as a biomarker of oxidative stress. **Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія**, n. 12, p. 90-97, 2010.

LARREGLE, E.V., VARAS, S. M.; OLIVEROS, L. B.; MARTINEZ, L. D.; ANTÓN, R.; MARCHEVSKY, E.; GIMÉNEZ, M. S. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1786-1792, 2008.

LEHMAN-McKEEMAN, L.D. Absorção, Distribuição e Excreção de Toxicantes. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.460. 2012.

LEVESQUE, H. M., MOON, T. W., CAMPBELL, P. G. C., HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3-4, p. 257-267, 2002.

LINS, J. A. P. N., KIRSCHNIK, P. G., QUEIROZ, V. D. S., CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, 2017.

LIU, X. J., LUO, Z., XIONG, B. X., LIU, X., ZHAO, Y. H., HU, G. F., LV, G. J. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 6, p. 1286-1291, 2010.

LIU, H., WANG, W., ZHANG, J., WANG, X. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 3, p. 350-354, 2006.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular; Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

LUCIA, M.; ANDRÉ, J. M.; GONZALEZ, P.; BAUDRIMONT, M.; BERNADET, M. D.; GONTIER, K.; MAURY-BRACHET, R.; GUY, G.; DAVAIL, S. Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata*. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 163, 2010.

MAES, V., BETOULLE, S., JAFFAL, A., DEDOURGE-GEFFARD, O., DELAHAUT, L., GEFFARD, A., PALLUEL, O., SANCHEZ, W., PALACIOS, S. P., VETTER, A. DAVID, E. Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) increase their anaerobic metabolism in response to copper exposure in laboratory conditions. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 900-913, 2016.

MARCANTONIO, A. S.; RANZANI-PAIVA, M. J.T.; MENEZES, F. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 2, p. 143- 154, 2011.

MARIANO, W.D.S.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B. D.; FERNANDES, M. N. Respostas fisiológicas de jeju (" *Hoplerythrinus unitaeniatus*") expostos ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, 2009.

MARKS, D.B., MARKS, A.D., SMITH, C.M., 1996. Basic medical biochemistry. Williams; Williams, Pennsylvania.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Bioindicadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) A bacia do rio Tibagi. Londrina, c.29, p.551-557, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology** v.64, n.4, p.797-807, 2004.

MORAES, G.; HACKBARTH, A.; ARBELAEZ-ROJAS, G.A.; FABRIZZI, F.; NUNES, C.S. Adaptações bioquímicas à natação sustentada em peixes com alto potencial para piscicultura. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá**, p. 269-294, 2009.

MEDEIROS, G.A., TRESMONDI, A.C.C.L., QUEIROZ, B.P.V., MELO, C.A., ROSA, A.H., NEGRO, C.V., FRACETO, L.F., RIBEIRO, A.I. 2013. Evaluation of metals in water and sediments of micro-basins in the city of Americana, São Paulo state, Brazil. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**. 172. 201-212. 10.2495/RBM130171.

MEDINA, M. F., GONZÁLEZ, M. E., KLYVER, S. M. R., ODSTRCIL, I. M. A. Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, n. 1, p. 229- 238, 2016.

MEMMERT, U., PEITHER, A., BURRI, R., WEBER, K., SCHMIDT, T., SUMPTER, J.P., HARTMANN, A. Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. **Environ. Toxicol. Chem.** 32 (2), 442–452. 2013.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S.K. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. **Environmental Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 368-374, 2007.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. Editora: Médica Massau, 2000.

MURRAY, R.T K.; GRANNER, D.K.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica ilustrada**. 27 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. 620 p.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

NAGARJUNA, A., KARTHIKEYAN, P., MOHAN, D., MARIGOUDAR, S. R., Effect of selenium on *Penaeus monodon* and *Perna viridis*: Enzyme activities and histopathological responses. **Chemosphere**, v. 199, p. 340-350, 2018.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora 6^o ed. p. 15. Porto Alegre. 2016.

OGA, S. SIQUEIRA, M.E.P.B; Introdução a toxicologia. In: OGA, S. CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. Editora Atheneu. 3^oed. São Paulo. 2008.

OGA, S. FARKSY, S.H.P, MARCOURAKIS, T.; Toxicocinética. In: OGA, S. CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. Editora Atheneu. 3^oed. São Paulo. 2008.

OLIVEIRA, D.S de. INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA: PARTE II. 1986.

ÖNER, M.; ATLI, G.; CANLI, M. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 360-366, 2008.

OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBIÁN, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Aoxicology**, v. 65, n. 3, p. 486-497, 2013.

PAETOW, L.J.; MCLAUGHLIN, J. D.; PAULI, B. D.; MARCOGLIESE, D. J. Mortality of American bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* infected by *Gyrodactylus jennyae* and experimentally exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 1, p. 15-26, 2013.

PARK, B.J., KIDD, K. 2005. Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of mink frogs and green frogs in the wild and in situ. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 2027-2036, 2005.

PARKINSON, A., OGILVIE, B.W Biotransformação de Xenobióticos. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.71. 2012.

PEAKALL, D.B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 157-160, 1994.

PEDRAZZI, F.J.M., CONCEICAO, F.T., SARDINHA, D.S., MOSCHINI-CARLOS, V., POMPEO, M. Avaliação da qualidade da água no reservatório de Itupararanga, Bacia do Alto Sorocaba (SP). **Geociências** 33 (1),26-38, 2014.

PIERRON, F.; BAUDRIMONT, M.; BOSSY, A.; BOURDINEAUD, J. P.; BRÈTHES, D.; ELIE, P.; MASSABUAU, J. C Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 304-311, 2007.

PILO, B.; GEORGE, J. C. Diurnal and seasonal variation in liver glycogen and fat in relation to metabolic status of liver and m. pectoralis in the migratory starling, *Sturnus roseus*, wintering in India. **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative physiology**, v. 74, n. 3, p. 601-604, 1983.

RANDALL, D. J.; FERRY, S. F. 4 Catecholamines. In: **Fish physiology**. Academic Press, 1992. p. 255-300.

RIBEIRO, A.C, OLIVEIRA BATISTA, M. T., RODRIGUES JUNIOR, E., FEIJÓ DE OLIVEIRA, M., SREE VANI, G., RODRIGUES, E., KAWAGOE SUDA, C. N. Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 4, 2015.

RIBEIRO-FILHO, M. R.; SIQUEIRA, J. O.; CURTI, N.; SIMÃO, J. B. P. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 2, 2001.

RIZZI, G. M. Efeito do cloreto de cádmio sobre as gônadas de girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). 2014. 84 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/108675>>.

RODRIGUEZ, J. A.; LINARES, M. J. Rana Toro y Sapo Marino: La Amenaza que Viene, los Controles Aduaneros que se Realizan en Canarias son Insuficientes. **Medio Ambiente CANARIAS. Revista de la Conserjería de Política Territorial y Medio Ambiente, Gobierno de Canarias**, n. 21, 2001.

ROMERO L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. **General and comparative endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 1-24, 2002.

ROSE, R.L.; HODGSON, E. Chemical and Physiological Influences on Xenobiotic Metabolism. **A Textbook of Modern Toxicology**, p. 163, 2004.

RUAS, C.B.G., CARVALHO, C.S., ARAUJO, H.S.S., ESPINDOLA, E.L.G., Fernandes, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of three cichlid species from a polluted river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 71, 86-93. 2008.

RÜDIGER, H.W. Biomonitoring in occupational medicine. In: **Toxicology**. 1999. p. 1027-1040.

SAKURAGUI, M.M., PAULINO, M.G., PEREIRA, C.D.S., CARVALHO, C.S., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., FERNANDES, M.N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 41-51, 2013.

SASSI, A.; ANNABI, A.; KESSABI, K.; KERKENI, A.; SAÏD, K; MESSAOUDI, I.. Influence of high temperature on cadmium-induced skeletal deformities in juvenile mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 403-409, 2010.

SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 549-556, 2010.

SFAKIANAKIS, D. G. RENIERI, E.; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A. M. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246-255, 2015.

SHEN, D.D. Toxicocinética. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.52. 2012.

SHULKIN, V. M.; KAVUN, V. Ya. The Concentrations of Trace Metals in the Soft Tissues of the Mytilid Mollusk *Septifer bilocularis* (Linnaeus, 1758) as a Possible Indicator of Water Quality at Coastal Coral Reefs of Vietnam. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 44, n. 1, p. 75-83, 2018.

SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. Conservation of Brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658, 2005.

SIVACHANDRAN, R.; SULTANA, Mazher. Effect of tannery effluent on lipid profiles in reproductive tissues of freshwater fish *Channa straitus*. **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 77-80, 2014.

SORENSEN, E. M. B. **Metal poisoning in fish**. CRC press, 1991.

SOUZA, M. R. D. P., HERRERIAS, T., ZALESKI, T., FORGATI, M., KANDALSKI, P. K., MACHADO, C., SILVA, D.T, PIECHNIK, C.A, MOURA, M.O, DONATTI, Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018.

SPIRO, T.G.; STIGLIANI, W.M. **Química ambiental**. Pearson Prentice-Hall, 2009.

STANKEVIČIŪTĖ, M.; SAULIUTĖ, G.; MAKARAS, T.; MARKUCKAS, A.; VIRBICKAS, T.; BARŠIENĖ, J. Responses of biomarkers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following exposure to environmentally relevant concentrations of complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd). Part II. **Ecotoxicology**, p. 1-18, 2018.

STRIMBU, K.; TAVEL, J.A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

STRYDOM, C.; ROBINSON, C.; PRETORIUS, E.; WHITCUTT, J. M.; MARX, J.; BORNMAN, M. S. The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology: a review. **Water SA**, v. 32, n. 4, p. 543-554, 2006.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free radical biology and medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

TEIXEIRA, P.C., DIAS, D.C., ROCHA, G.C., ANTONUCCI, A.M., FRANÇA, F.M., MARCANTONIO, A.S., RANZANI-PAIVA, M.J.T., FERREIRA, C.M. Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 91-98, 2012.

TREVISAN, R. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. 2008. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TOCHER, M.; GASCON, C.; MOUTINHO, P. Diferenças na composição de espécies de sapos entre três tipos de floresta e campo de pastagem na Amazônia central. Floresta Amazônica: Dinâmica, Regeneração e Manejo. Amazonas, Manaus: Ministério da Tecnologia e Ciência, Instituto de Pesquisas da Amazônia, p. 219-232, 1998.

TOPPI, L. S.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 41, n. 2, p. 105-130, 1999.

THIRUMAVALAVAN, R. Effect of copper on carbohydrate metabolism fresh water fish, *Catla catla*. **Asian Journal of Science and Technology**. Vol. 5, pp.095-099, 2010.

USEPA (2001). Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA-822-R-01-001

UTSUNOMIYA, H.S.M. Estresse oxidativo em fígado de girinos de rãs-touro expostos a cádmio, zinco e cobre. 2015. 59 f. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, 2015.

VAGLIO, A.; LANDRISCINA, C. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 1, p. 111-116, 1999.

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

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. PE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VASCONCELOS, S.M.L., GOULART, M.O.F., MOURA, J.B.F., MANFREDINI, V. BENFATO, M.S., KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova** 30 (5), 1323- 1338. 2007.

VENUGOPAL, N. B. R. K.; REDDY, S. L. N. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium in a teleost fish *Anabas scandens*: enzymological and biochemical changes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 24, n. 3, p. 287-293, 1992.

VERMA, A. K., PAI, A. K., MANUSH, S. M., DAS, T., DALVI, R. S., CHANDRACHOODAN, P. P., RAVI, P.M, APTE, S. K Persistent sub-lethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 87, n. 3, p. 229-237, 2007.

VERONEZ, A.C.S.; SALLA, R. V.; BARONI, V. D.; BARCAROLLI, I. F.; BIANCHINI, A.; DOS REIS MARTINEZ, C. B.; CHIPPARI-GOMES. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 101-108, 2016.

VIEIRA, V. A. R.O. Regulação Gênica Dos Receptores Dos Hormônios Tireoideanos Durante A Metamorfose De Anfíbios Anuros. **Revista da Biologia**. V.4, p.16-21, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

WARREN, L. A.; HAACK, E.A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. **Earth-Science Reviews**, v. 54, n. 4, p. 261-320, 2001.

WDZIĘCZAK, J., ZALEŚNA, G., WUJEC, E., PERES, G. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 361-365, 1982.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WILHELM, F. D. Fish antioxidant defenses--a comparative approach. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 29, n. 12, p. 1735-1742, 1996.

WILLIAMS, N.D.; HOLDWAY, D.A. The effects of pulse-exposed cadmium and zinc on embryo hatchability, larval development, and survival of Australian crimson spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Environmental Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 165-173, 2000.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. 1993.

WOJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 1, p. 71-80, 2004.

WUANA, R.A.; OKIEIMEN, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **Isrn Ecology**, v. 2011, 2011.

YENGGOKPAM, S., DEBNATH, D., Pal, A. K., SAHU, N. P., JAIN, K. K., NOROUZITALLAB, P., BARUAH, K Short-term periodic feed deprivation in *Labeo rohita* fingerlings: effect on the activities of digestive, metabolic and anti-oxidative enzymes. **Aquaculture**, v. 412, p. 186-192, 2013.

YOUSEF, M. I.; El-Demerdash, F. M.; Kamel, K. I.; Al-Salhen, K. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. **Toxicology**, v. 189, n. 3, p. 223-234, 2003.

ZHENG, J. L., LUO, Z., LIU, C. X., CHEN, Q. L., TAN, X. Y., ZHU, Q. L., GONG, Y. Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquatic Toxicology**, v. 132, p. 173-181, 2013.

ZHU, Q.L., Luo, Z., Zhuo, M. Q., Tan, X. Y., Sun, L. D., Zheng, J. L., Chen, Q. L In vitro exposure to copper influences lipid metabolism in hepatocytes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 595-605, 2013.

ZHU, B.; WU, Z. F.; LI, J.; WANG, G. X. Single and joint action toxicity of heavy metals on early developmental stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2193-2202, 2011.

ZIRINO, A.; YAMAMOTO, S. A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 17, n. 5, p. 661-671, 1972.

APÊNDICE A – CURVAS PADRÕES

Figura 26. Curva padrão glicose

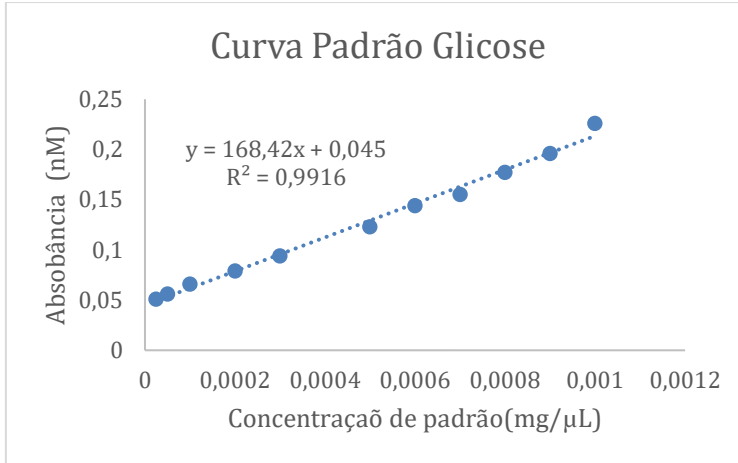


Figura 27. Curva padrão proteínas

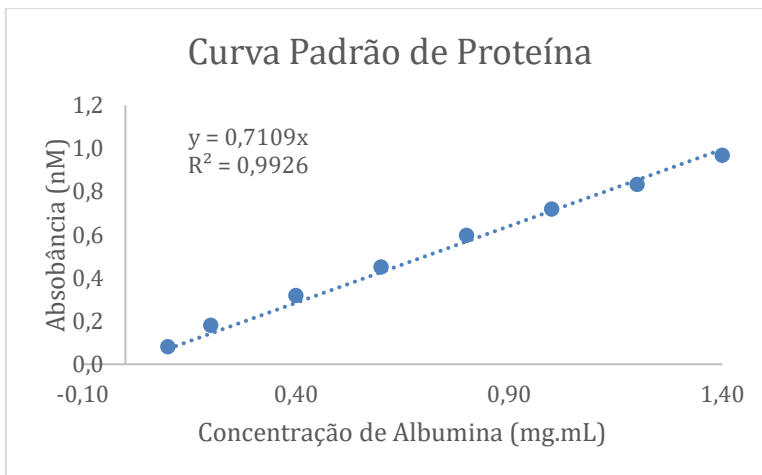
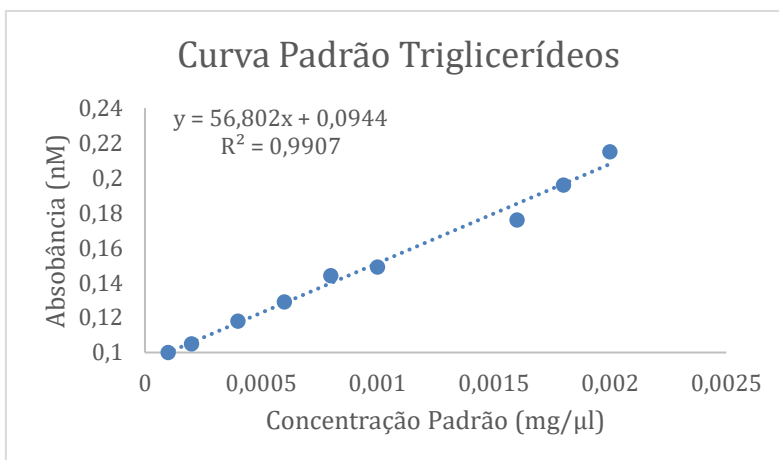


Figura 28. Curva padrão triglicerídeos



ANEXO A - COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS *Lithobates catesbeianus*

Este estudo faz parte do projeto o qual teve financiamento da FAPESP sob o no. 50752-3/2011. Os experimentos de exposição aos metais foram realizados e finalizados e os tecidos foram congelados em biofreezer -80°C.

Os girinos de *Lithobates catesbeianus* (syn. *Rana catesbeiana*) (Shaw, 1802) (massa corporal = $2,09 \pm 0,20$ g) foram fornecidos pela Fazenda Santa Rosa (Santa Bárbara d'Oeste, SP, Brasil) ($22^{\circ}46'53,0''S$ / $47^{\circ}24'17,7''W$). Girinos (~ 500 animais) foram mantidos em densidades de um espécime por litro de água e aclimatados em tanques de 30 L contendo água declorada por 10 dias com fluxo contínuo de água ($1,2 \text{ L h}^{-1}$) e aeração, temperatura controlada (25 ± 1 °C) mantendo um fotoperíodo natural (~ 12 h de luz, 12 h de escuro). A água foi monitorada diariamente e os parâmetros físicos e químicos foram mantidos em: pH 7,2-7,6, oxigênio dissolvido 7,0-7,5 mg.L^{-1} , dureza 51-58 mg.L^{-1} (como CaCO_3) e condutividade $97-56 \pm 0,02 \mu\text{S.cm}^{-1}$. As concentrações de amônia na água foram verificadas todos os dias (K-1510; CHEMets) e permaneceram em $<1 \text{ mg.L}^{-1}$. Foram realizadas análises dos metais Zn, Cu e Cd e não foram detectadas presença de metais na água usada para aclimação e nos grupos controle durante a exposição aos metais. A análise destes metais na água e nos órgãos dos grupos controle e expostos foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) em forno de grafite (Perkin Elmer SIMAA 6000) (ANEXO C) (UTSUNOMIYA, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017).

Os girinos foram mantidos nestas condições até o estágio 25 de Gosner, que foi selecionado porque é caracterizado pelo início da alimentação independente (GOSNER, 1960). Os girinos foram alimentados *ad libitum* diariamente em ração comercial seca contendo 35-40% de proteína bruta (Alcon®) durante a aclimação. Durante a exposição de 2 dias os animais não foram alimentados e a água não foi trocada para evitar o estresse. A alimentação foi suspensa 48 horas antes do início do teste e durante a exposição de 16 dias os girinos foram alimentados a cada 48 horas.

Os animais foram divididos em 8 grupos, cada grupo contendo 12 animais para cada exposição (2 dias e 16 dias). O grupo controle (CTR) foi mantido em água limpa. Os demais grupos foram expostos ao cloreto de zinco (Zn), sulfato de cobre (Cu), cloreto de cádmio (Cd), cloreto de zinco e sulfato de cobre (Zn+Cu), cloreto de zinco e cloreto de cádmio (Zn+Cd) sulfato de cobre e cloreto de cádmio (Cu+Cd), cloreto de zinco, sulfato de cobre e cloreto de cádmio (Zn+Cu+Cd) às concentrações subletais ($1\mu\text{g.L}^{-1}$) para água de classes 1 e 2 pela resolução CONAMA 357 (2005) por 2 e 16 dias em sistema semi-estático. Cada concentração

de metal ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) correspondeu a $0,015 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para Zn, $0,016 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para Cu e $0,009 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para Cd. Os testes foram realizados no laboratório de Diversidade Vegetal.

Os animais do grupo controle, bem como dos grupos expostos permaneceram nessas condições por 2 e 16 dias em sistema semi-estático, durante as quais o comportamento dos animais foi observado regularmente. A renovação da água e a concentração dos metais, nos experimentos a 16 dias, foi de 100% do volume a cada 72 horas, com abastecimento individual, aeração permanente e a temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000).

Após o período experimental (2 e 16 dias) os animais foram anestesiados com benzocaina (0,01%), mortos por secção medular de acordo com a recomendação da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2001) e os tecidos coletados e imediatamente congelados a -80°C para as análises bioquímicas.

Este estudo teve aprovação do Comitê do Conselho de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) protocolo no. 2477200318 e aprovação no. 017/2011.

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Biomarcadores de exposição a metais em girinos de rã-touro.", protocolada sob o CEUA nº 2477200318, sob a responsabilidade de **Cleoni dos Santos Carvalho e equipe; Bianca Roberta Catani Chagas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 16/04/2018.

We certify that the proposal "Biomarkers of metal exposure in bullfrog tadpoles.", utilizing 576 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 2477200318, under the responsibility of **Cleoni dos Santos Carvalho and team; Bianca Roberta Catani Chagas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/16/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018 a 03/2019** Área: **Biologia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Anfíbios** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **9 a 20 dias** N: **576**

Linhagem: **Lithobates catesbeianus** Peso: **3 a 9 g**

Resumo: Estudos apontam que a exposição ao metal causa um aumento das reservas metabólicas para a desintoxicação e a manutenção da homeostase em organismos aquáticos. Ademais, para fornecer a demanda de energia durante os processos de desintoxicação e reparação os organismos aquáticos expostos a metais mobilizam as principais reservas de energia, carboidratos (glicogênio e/ou glicose), lipídeos e proteínas do fígado. Neste sentido, cada via metabólica é continuamente regulada para manter a homeostase e controlar o fluxo metabólico. O efeito dos metais nos processos de síntese de energia celular e os diferentes níveis de regulação é de se esperar que o impacto destes elementos sobre a biota aquática, neste caso, os anfíbios, seja expressivo. OBSERVAÇÃO: Este estudo faz parte do projeto o qual teve financiamento da FAPESP sob o no. 50752-3/2011. Os experimentos de exposição aos metais foram realizados e finalizados e os órgãos estão congelados em biofreezer -80oC. O projeto teve aprovação da CEUA sob no. 021/2011. Os experimentos foram realizados e o projeto financiado pela FAPESP também foi finalizado. No entanto, os órgãos coletados e que não foram utilizados estão congelados para serem utilizados pela estudante de mestrado e aluno de IC (ainda não definido).

Local do experimento: Os experimentos de coleta e manutenção foram realizados no laboratório de fisiologia vegetal da Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba-SP.

São Carlos, 30 de abril de 2018

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO C – TABELAS DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS NOS TECIDOS

Tabelas referente ao trabalho de Carvalho *et al.*, 2017.

Table 1

The mean values \pm standard error of mean of Zn, Cu and Cd in the liver of bullfrog tadpoles, *L. catesbeianus*, exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ or a mixture of Zn, Cu and Cd. The metal concentrations are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. Six-seven animals were used in each experimental group. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the control; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the isolated and combined exposed groups; and ^a indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the exposure time ($p < 0.05$). NQ = not quantified ($< \text{LOQ}$).

Metals	Exposure Time/Groups							
	2 days							
	Control	Zn	Cu	Cd	Zn + Cu	Zn + Cd	Cu + Cd	Zn + Cu + Cd
Zn	14.72 \pm 2.7	62.61 \pm 5.7*	NQ	NQ	51.26 \pm 8.4*	53.02 \pm 7.5*	NQ	115.69 \pm 30**
Cu	0.42 \pm 0.2	NQ	0.66 \pm 0.1*	NQ	0.97 \pm 0.04*#	NQ	0.76 \pm 0.1*	0.61 \pm 0.1*
Cd	0.33 \pm 0.26	NQ	NQ	14.74 \pm 2.4*	NQ	35.73 \pm 2.8**	59.17 \pm 11.0**	60.98 \pm 3.7**
16 days								
Zn	12.46 \pm 1.7	65.35 \pm 7.2*	NQ	NQ	102 \pm 18.3** ^a	134.8 \pm 29** ^a	NQ	60.56 \pm 10.9** ^a
Cu	0.34 \pm 0.04	NQ	1.31 \pm 0.14 ^a	NQ	1.17 \pm 0.1 ^a	NQ	0.71 \pm 0.10**	0.72 \pm 0.10**
Cd	0.28 \pm 0.03	NQ	NQ	4.17 \pm 0.60 ^a	NQ	3.13 \pm 0.5** ^a	2.16 \pm 0.20** ^a	0.79 \pm 0.03** ^a

Table 2

The mean values \pm standard error of mean of Zn, Cu and Cd in the kidney of bullfrog tadpoles, *L. catesbeianus*, exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ or a mixture of Zn, Cu and Cd. The metal concentrations are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. Six-seven animals were used in each experimental group. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the control; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the isolated and combined exposed groups; and ^a indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the exposure time ($p < 0.05$). NQ = not quantified ($< \text{LOQ}$).

Metals	Exposure Time/Groups							
	2 days							
	Control	Zn	Cu	Cd	Zn + Cu	Zn + Cd	Cu + Cd	Zn + Cu + Cd
Zn	129.74 \pm 9.27	911.47 \pm 141*	NQ	NQ	546.39 \pm 140**	82.2 \pm 9.2**	NQ	222.15 \pm 39**
Cu	14.47 \pm 8.64	NQ	152.2 \pm 15*	NQ	410.36 \pm 35**	NQ	120.84 \pm 4.2**	171.29 \pm 15*
Cd	4.64 \pm 1.4	NQ	NQ	225.9 \pm 8.1*	NQ	165.8 \pm 266**	196.29 \pm 20*	243.95 \pm 8.2*
16 days								
Zn	117.32 \pm 10.3	1527 \pm 176** ^a	NQ	NQ	193.15 \pm 12.9** ^a	122.42 \pm 31** ^a	NQ	291.0 \pm 0.89** ^a
Cu	11.07 \pm 5.76	NQ	257.8 \pm 14** ^a	NQ	169.12 \pm 18** ^a	NQ	141.86 \pm 6** ^a	304.23 \pm 2.6** ^a
Cd	5.29 \pm 1.5	NQ	NQ	36.11 \pm 3.7** ^a	NQ	51.5 \pm 6.8** ^a	75.23 \pm 4.4** ^a	199.98 \pm 2.7** ^a

Table 3

The mean values \pm standard error of mean of Zn, Cu and Cd in the muscle of bullfrog tadpoles, *L. catesbeianus*, exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ or a mixture of Zn, Cu and Cd. The metal concentrations are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. Six-seven animals were used in each experimental group. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the control; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the isolated and combined exposed groups; and ^a indicates a significant difference ($p < 0.05$) compared to the exposure time ($p < 0.05$). NQ = not quantified ($< \text{LOQ}$).

Metals	Exposure Time/Groups							
	2 days							
	Control	Zn	Cu	Cd	Zn + Cu	Zn + Cd	Cu + Cd	Zn + Cu + Cd
Zn	23.02 \pm 2.5	146.47 \pm 93*	NQ	NQ	200.21 \pm 47.8*	199.34 \pm 52.5*	NQ	149.18 \pm 35*
Cu	14.65 \pm 2.2	NQ	27.43 \pm 1.9*	NQ	58.83 \pm 17.1**	NQ	64.21 \pm 10.5**	60.74 \pm 20.7**
Cd	0.31 \pm 0.1	NQ	NQ	0.41 \pm 0.1*	NQ	3.53 \pm 0.4**	2.05 \pm 0.20**	5.54 \pm 0.1**
16 days								
Zn	21.64 \pm 19.3	441.8 \pm 47*	NQ	NQ	64.8 \pm 4.3** ^a	63.25 \pm 17** ^a	NQ	26.8 \pm 1.9** ^a
Cu	10.89 \pm 1.8	NQ	32.27 \pm 4.8*	NQ	39.78 \pm 5.4*	NQ	19.84 \pm 2.3** ^a	30.93 \pm 4.6** ^a
Cd	0.48 \pm 0.1	NQ	NQ	7.08 \pm 1.60** ^a	NQ	3.61 \pm 0.2** ^a	5.45 \pm 1.4** ^a	28.85 \pm 3.6** ^a