

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLOGIAS**  
**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA ASSIMILAÇÃO E  
RETENÇÃO DE CROMO POR PEIXES TAMBAQUIS (*Colossoma  
macropomum*) EXPOSTOS AO CROMO HEXAVALENTE**

**MARCELO NUNES MESTRINER**

Ribeirão Preto - SP  
Agosto/2016

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLOGIAS**  
**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA ASSIMILAÇÃO E  
RETENÇÃO DE CROMO POR PEIXES TAMBAQUIS (*Colossoma  
macropomum*) EXPOSTOS AO CROMO HEXAVALENTE**

**MARCELO NUNES MESTRINER**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maristela Silva Martinez**

Ribeirão Preto - SP

Agosto/2016

**Marcelo Nunes Mestriner**

**“ Análise quantitativa e qualitativa da assimilação e retenção de Cromo por exemplares juvenis de peixes tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente”.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto.

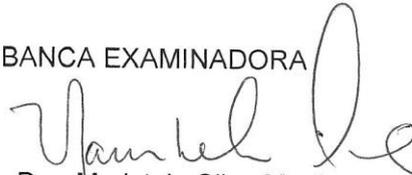
Orientadora: Maristela Silva Martinez

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Data de defesa: 30 de agosto de 2016

Resultado: APROVADO

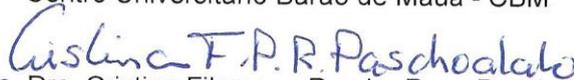
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maristela Silva Martinez  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP  
Presidente



Profa. Dra. Andréa Cristina Tomazelli  
Centro Universitário Barão de Mauá - CBM



Profa. Dra. Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da  
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

M586a Mestriner, Marcelo Nunes, 1962-  
Análise quantitativa e qualitativa da assimilação e retenção de  
Cromo por peixes tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos  
ao Cromo Hexavalente / Marcelo Nunes Mestriner. - - Ribeirão  
Preto, 2016.

75 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Silva Martinez.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Tecnologia Ambiental. Ribeirão Preto, 2016.

1. Cromo hexavalente. 2. Bioindicador. 3. *Colossoma  
macropomum*. I. Título.

CDD 628

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Silva Martinez, que viabilizou, através de sua orientação e vasto conhecimento, a execução desse trabalho, me apoiando, entendendo e atenuando minhas inseguranças e relação à execução do trabalho

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato pela participação da análise e sugestões para esse trabalho, tanto na banca de qualificação, como na defesa dessa dissertação, sempre se mostrando empenhada em me animar com o projeto, fornecendo incentivos e sugestões extremamente úteis.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rezende Alves de Oliveira, por me ajudar, com suas sugestões e recomendações, a decidir os rumos biológicos de meu trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Cristina Tomazelli, por participar de minha banca de avaliação com colocações e sugestões de grande valia e por estar sempre presente, suportando e me aconselhando em minhas ansiedades relativas ao projeto.

A minha esposa Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Dinamarco Mestriner, pela dedicação e tolerância dispensadas às minhas dúvidas e ansiedades, bem como pela ajuda na execução das etapas desse trabalho.

A parceira e amiga Prof<sup>a</sup>. Me. Ana Rosa Crisci pelo incentivo em momentos de incertezas e percalços relacionados à execução desse trabalho.

A reitoria do Centro Universitário “Barão de Mauá”, principalmente à Digníssima Reitora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Maria Pamplona Guimarães e à Pró-reitora de Pós-graduação, Extensão e Iniciação Científica Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joyce Maria Worschech Gabrielli pelo apoio ao meu trabalho, viabilizando a utilização do ambiente próprio para a realização da pesquisa em uma das etapas mais importante de meu trabalho.

Ao corpo técnico dos laboratórios do centro universitário “Barão de Mauá” pelo incansável apoio logístico fornecido, sem o qual a execução desse trabalho seria impossível.

Ao pessoal de apoio e alunos envolvidos com as atividades laboratoriais do curso de Engenharia Química da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), que me apoiaram com auxílios diretos e indiretos, bem como, com sugestões para a execução desse trabalho.

Aos proprietários e funcionários da Piscicultura Santa Cândida em Santa Cruz da Conceição, SP, pelo fornecimento do material biológico para execução do trabalho, bem como pela receptividade, acolhimento e empenho em solucionar as demandas relacionadas com o trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, pela parceria, companhia, interesse e incentivo durante o acompanhamento das disciplinas e também durante a execução do trabalho.

Ao meu amigo e mentor para assuntos de aquarofilia Davi Massaro pela consultoria fornecida em relação aos assuntos associados com a criação e estabilização dos peixes utilizados.

Ao pessoal de segurança do Centro Universitário “Barão de Mauá” e da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) pela simpatia e paciência com minhas visitas de trabalho fora dos horários de expediente.

E a todos os outros que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>05</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>08</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>09</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1. Características químicas e aplicações do cromo .....	21
3.2. Ecotoxicologia .....	22
3.3. Características morfológicas das brânquias, pele e fígado de Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) .....	25
3.4. Influência do Cromo sobre sistemas biológicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1. Aclimação e preparo dos aquários para os espécimes .....	30
4.2. Preparo dos ambientes de exposição ao cromo hexavalente .....	32
4.3. Transferência de espécimes para o ambiente do experimento .....	32
4.4. Características das baterias dos aquários utilizados .....	33
4.5. Análise quantitativa da contaminação por cromo .....	35
4.6. Análise histopatológica das brânquias, pele e fígado dos animais .....	37
4.7. Determinação da concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para peixes Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) em contaminação aguda por cromo hexavalente .....	40
4.8. Preparo da bateria de aquários para exposição dos animais ao Cromo hexavalente .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1. Dados relativos à água dos reservatórios .....	46
5.2. Cromo total presente nos peixes nos períodos de 5, 10 e 15 dias .....	48
5.2.1 Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 5 dias.....	48
5.2.2. Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 10 dias.....	50

5.2.3. Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 15 dias.....	51
5.2.4 Análise geral dos dados estatísticos referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente nos períodos de 5, 10 e 15 dias.....	52
5.3. Dados biométricos dos Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) utilizados nos experimentos realizados .....	53
5.4. Dados referentes à análise histopatológica das brânquias, pele e fígado de Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) expostos a diferentes concentrações de cromo hexavalente. ....	57
5.4.1. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, pele e fígado de Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 5 dias.....	56
5.4.2. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, epiderme e fígado de Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 10 dias.....	58
5.4.3. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, pele e fígado de Tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 15 dias.....	60
5.5. Determinação da CL <sub>50</sub> para exemplares juvenis de peixes tambaquis ( <i>Colossoma macropomum</i> ) em exposição à solução de Cromo hexavalente.....	64
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Equipamentos e produtos utilizados na análise de parâmetros ambientais. A: pH, B: teste para O<sub>2</sub> dissolvido Labcon Teste, C: removedor de Cloro Prime

FIGURA 2 – A: Caixa de polietileno FORTLEV – 250 L para a aclimação dos animais, B: Disposição da caixa de aclimação no laboratório, C: Visão superior (observação do filtro externo e de bomba de aeração submersa), D: Detalhe do filtro externo

FIGURA 3 – Caixas para a realização do experimento. A: Caixa de polietileno FORTLEV para 150L, B: Preparação da tela de proteção, C: Caixa de polietileno com a tela, D: Sistema de fixação de tela protetora

FIGURA 4 – Piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, São Paulo

FIGURA 5 – Bomba de aeração submersa com ventosas

FIGURA 6 – Esquema ilustrativo com dimensões da caixa d'água de polietileno para 150 litros da FORTLEV.

FIGURA 7 – Dados biométricos analisados nos peixes.

FIGURA 8 – Secagem dos peixes em estufa. A: Interior da estufa para secagem dos peixes, B: Cadinhos com os peixes, C: Estufa para secagem dos peixes – vista geral

FIGURA 9 – Equipamento para a análise por espectrofotometria de absorção atômica

FIGURA 10 – Laboratório de técnicas histológicas. A: Visão geral, B: Bateria para processamento de coloração HE, C: Micrótomo, D: Lâminas confeccionadas

FIGURA 11 – Microscópio Nikon Eclipse E200

FIGURA 12 – Cortes histológicos de pele, mostrando a medida da espessura da epiderme (A), fígado, com medida de área e perímetro dos hepatócitos (B) e comprimento das lamelas secundárias dos filamentos brônquiais (C), utilizados para as análises qualitativas. Aumento total: 200X, coloração: Hematoxilina e Eosina (H-E)

FIGURA 13 - Câmera Tucsen USB 2.0 H. Series

FIGURA 14 – Bateria de exposição ao cromo (seis animais). A: Detalhe da seção de manutenção e transferência de temperatura. B: Bateria em visão geral

FIGURA 15 – Termostato *Hopar H- 606 Aquarium Heater de 75w*

FIGURA 16 – Bateria inicial para o teste de seis animais e um animal controle

FIGURA 17 – Expansão da bateria para análise de doze animais teste e um controle.

FIGURA 18 – Representação da temperatura da água nos reservatórios durante os experimentos

FIGURA 19 - Média e desvio padrão da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 5 dias.

FIGURA 19 - Média e desvio padrão da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 10 dias.

FIGURA 20 - Média e desvio padrão da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 15 dias.

FIGURA 21 - Comprimento zoológico dos peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 5 dias.

FIGURA 22 – Comprimento zoológico dos peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 10 dias.

FIGURA 23 - Comprimento zoológico dos peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 15 dias.

FIGURA 24 - Comprimento padrão dos peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 5 dias.

FIGURA 25 - Comprimento padrão dos peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 10 dias.

FIGURA 26 - Comprimento padrão dos peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 15 dias.

FIGURA 27 – Comprimento dos filamentos branquiais de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

FIGURA 28 - Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

FIGURA 29 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

FIGURA 30 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

FIGURA 31 - Comprimento dos filamentos branquiais de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

FIGURA 32 – Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

FIGURA 33 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

FIGURA 34 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

FIGURA 35 - Comprimento dos filamentos branquiais de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

FIGURA 36 - Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

FIGURA 37 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

FIGURA 38 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias

FIGURA 39 - Fotomicrografia de brânquias (A), pele (B) e fígado (C) de animal controle pertencente ao grupo de 15 dias. Aumento total: 200X, coloração: hematoxilina e Eosina (H-E).

FIGURA 40 - Fotomicrografia de brânquias animal pertencente ao grupo de 15 dias, demonstrando a hiperplasia do espaço interlamelar (A e B) e hiperplasia com completo preenchimento do espaço interlamelar (C). Aumento total: 200X, coloração: Hematoxilina e Eosina (H-E)

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – pH da água dos reservatórios durante os experimentos

TABELA 2 – Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de peixes (kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 5 dias.

TABELA 3 – Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de peixes (kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 10 dias.

TABELA 4 - Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de peixes (kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 15 dias.

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Relação entre a atividade humana e seus impactos nos ecossistemas aquáticos

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA – Agência Nacional de Água

SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

ATP – Adenosina trifosfato

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal para 50% da população.

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto

## RESUMO

Os metais correspondem a um grupo de componentes químicos de grande importância para a utilização humana e, dentre eles, encontramos o Cromo; um elemento utilizado para uma série de processos, como o revestimento de peças, na indústria coureiro-calçadista, fixadores de tintas na indústria têxtil, dentre outras aplicações. Com a utilização do Cromo surge também a preocupação com seu descarte, pois esse elemento apresenta relações com problemas de saúde humana e ambiental, elevando o interesse em relação a sua identificação e quantificação em ambientes aquáticos. O uso de bioindicadores tem sido uma promessa nesse sentido, pois além de não necessitar grande desenvolvimento tecnológico e não ser dispendioso, apresenta como um fator de baixa interferência nas condições ambientais. Dessa forma, esse estudo tem como objetivo analisar a viabilidade do uso de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*), um exemplar de ictiofauna de rios do norte do Brasil, como bioindicador para a contaminação aquática por Cromo hexavalente, por meio da constatação de um padrão de proporcionalidade entre a absorção de Cromo pelos animais em três concentrações ambientais de Cromo hexavalente (0,05 mg/L, 0,5 mg/L e 5 mg/L), bem como identificar, por análise histológica, padrões quantitativos e qualitativos de alterações em três estruturas orgânicas dos peixes (brânquias, pele e fígado) de animais expostos às três concentrações em períodos de 5, 10 e 15 dias, além de estabelecer o valor da concentração letal desse componente químico em diluição, para 50 % de uma população tambaquis juvenis (*Colossoma macropomum*), também conhecida como CL<sub>50</sub>, em um período de 96 horas de exposição. Os resultados obtidos para a absorção de Cromo pelos animais experimentais demonstraram um grau de proporcionalidade compatível com as concentrações utilizadas e os períodos de tempo estudados. Na análise histopatológica, os aspectos qualitativos associados à arquitetura histológica de brânquias mostraram alterações significativas em animais expostos a concentração de Cromo de 5 mg/L por um período de 15 dias. Os resultados quantitativos, entretanto, não indicaram alterações no comprimento das lamelas secundárias de brânquias, espessura da epiderme e no perímetro e área dos hepatócitos. A Concentração letal para 50% da população de peixes expostos ao Cromo hexavalente (CL<sub>50</sub>), em 96 horas, foi de 27,5 mg/L.

Palavra-chaves: Cromo hexavalente, bioindicador, *Colossoma macropomum*, CL<sub>50</sub>.

## ABSTRACT

The metals correspond to a group of chemicals of great importance for human use and among them is the Chromium, an element used for a variety of processes, such as plating parts, in the leather and shoe industry, dye fixatives in the textile industry, among other applications. Using the Chrome also comes the concern for their disposal, because this element has relationships with environmental and human health problems, raising the interest in the identification and quantification in aquatic environments. The use of biomarkers has been a promise in this direction, because this method does not present major technological endeavors, or considerable expense, and present as a factor of low interference in environmental conditions. Thus this study aims to analyze the feasibility of using Tambaquis fish (*Colossoma macropomum*), a copy of fish fauna of northern rivers in Brazil, such as bio-indicator for the water contamination Hexavalent Chromium by finding a pattern of proportionality between Chromium absorption by the animals for three environmental concentrations of hexavalent chromium (0.05 mg/L, 0.5 mg/L and 5 mg/L), as well as identifying by histological analysis, quantitative and qualitative standards for the presence of alterations in three fish organic structures (gills, skin and liver) for animals exposed to three concentrations in periods of 5, 10 and 15 days, in addition to establishing the value of lethal concentration of this chemical compound dilution to 50% one juvenile Tambaquis population (*Colossoma macropomum*), also known as  $CL_{50}$  in a period of 96 hours of exposure. The results obtained for the absorption of chromium in experimental animals have shown a degree of proportionality compatible with the concentrations used and time periods studied. In the histological analysis, the qualitative aspects associated with the histological structure of gills showed significant changes in animals exposed to concentrations of chromium of 5 mg/L of 5 mg/L for a period of 15 days, the quantitative results, however, did not indicate changes in the length of secondary lamellae of gills, thickness epidermis and on the perimeter and area of hepatocytes. The lethal concentration at 96 hours for 50% of the population of exposed fish ( $LC_{50}$ ) was 27.5 mg/L Hexavalent Chromium.

Keywords: Hexavalent chromium, bioindicator, *Colossoma macropomum*  $LC_{50}$ .

## 1. INTRODUÇÃO

A questão da água superficial mundial é um assunto extremamente relevante nas discussões ecológicas, de recursos energéticos e de saúde humana, sendo, no momento, uma questão emergencial, tendo em vista a crise hídrica mundial. No Brasil o problema tem se agravado devido o estado de vários reservatórios nacionais, como os do sistema Cantareira, após a seca ocorrida em 2014, além da seca observada no estado do Espírito Santo e o problema hídrico crônico da região Nordeste.

O Brasil é um país beneficiado no que se refere à água doce de superfície, pois apresenta, segundo manual distribuído pela Agência Nacional de Água (ANA) do Ministério do Meio Ambiente – *Panorama da Qualidade das Águas Superficiais do Brasil (2012)*, 12% de toda água doce superficial do planeta; sendo a maior parte desse conteúdo, cerca de 80%, encontrado na região amazônica.

O estado de São Paulo apresenta 1,6% desse manancial (SABESP, 2015), fato que nos coloca em uma posição privilegiada, porém também de grande responsabilidade, em relação a esse recurso natural.

A água em estado líquido é um recurso essencial à vida terrestre, sendo, devido às suas características, responsável por funções vitais, como transporte de substâncias dentro e entre organismos, controle da temperatura, proteção mecânica e, principalmente, como palco de reações metabólicas; sendo tais reações inerentes aos seres vivos e distinguindo-os dos outros componentes do nosso planeta. A vida, como conhecida, apresenta suas bases em ambientes aquáticos, mesmo quando o organismo se encontra no ambiente terrestre, pois a ausência da água inviabiliza a manutenção dos processos vitais. No homem, a quantidade de água atinge cerca de 60 % da massa total corporal e a perda de apenas 10 % desse conteúdo pode levar a óbito.

Em uma análise geral, tem-se como principais agravos à quantidade e qualidade dos mananciais, de um lado a escassez dos recursos, utilizados de forma excessiva e pouco programada, e, de outro, os rejeitos e poluentes liberados na água pelos processos domésticos, agrícolas, industriais, entre outros.

Como consequências diretas relacionadas ao mau uso da água de superfície, podem ser citadas:

- A degradação da qualidade da água superficial e subterrânea;

- O aumento das doenças de veiculação hídrica e impactos na saúde humana;
- A diminuição da água disponível per capita;
- O aumento no custo da produção de alimentos;
- O impedimento ao desenvolvimento industrial e agrícola;
- O aumento dos custos de tratamento de água.

Os sais minerais, por sua vez, são elementos que participam de uma das grandes classes químicas encontradas em nosso planeta, ou seja, junto às bases e aos ácidos, compõem o trio básico de substâncias químicas da Terra. A origem mais comum desses compostos é o meio abiótico, composto por estruturas inorgânicas; sendo encontrados mais facilmente no ambiente mineral. Sua presença, entretanto, em ambientes bióticos é fundamental, sendo, inclusive, em muitos casos, essenciais aos processos metabólicos. Alguns dos sais minerais fundamentais aos processos orgânicos são o cálcio, importante na composição dos ossos e dentes, coagulação sanguínea, e contração muscular; o fósforo, presente nos ossos, dentes, em processos energéticos e na composição das subunidades do material genético; o nitrogênio, que também compõe as subunidades do material genético e das proteínas, além de moléculas fundamentais ao metabolismo como o ATP (Adenosina trifosfato), NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (Flavina adenina dinucleotídeo); o ferro, presente na molécula de hemoglobina e o iodo, encontrado nos principais hormônios tireoidianos, entre outros.

Alguns metais contaminantes, elementos com grande reatividade e/ou bioacumuláveis, apresentam propriedades importantes a serem consideradas quando se pretende estudar analisar a qualidade ambiental, associada à saúde de seres vivos (Aguiar et al., 2002). São exemplos desses metais contaminantes: Cromo, Chumbo, Mercúrio, Cádmio, Níquel, entre outros.

Cada metal contaminante provoca, em casos de intoxicação, um conjunto específico de sintomas e um quadro clínico típico, sendo os principais mecanismos de interferência orgânica apresentados pelos metais, a interação com grupos funcionais de enzimas e a combinação com membranas celulares; interferindo ou impedindo o transporte de substâncias por essas estruturas, principalmente de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . No caso de gestação, o feto também poderá receber as influências negativas da intoxicação (Aguiar et al., 2002).

O Cromo ocorre naturalmente em rochas, animais, plantas e no solo; pode se apresentar na forma de íons com valência  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ , e é utilizado em diversos processos industriais. As formas mais importantes para a saúde humana são o  $\text{Cr}^{3+}$  (Cromo trivalente), essencial para o metabolismo, e o  $\text{Cr}^{6+}$  (Cromo hexavalente), um potente agente mutagênico que pode causar carcinomas, entre outras patologias (Chirwa e Wang, 2000).

Seu uso nas indústrias está relacionado com a resistência à corrosão, sendo empregado em ligas metálicas ácido-resistentes, tintas anticorrosivas, em operações de cromagem (ácido crômico) e na impregnação de madeira (Miranda et al., 2011). No Rio Grande do Sul, destaca-se a poluição causada pelos resíduos na indústria coureiro-calçadista. No curtimento de peles ocorre a geração de lodos nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), principalmente de Cromo, por ser o mais utilizado no processamento (Conceição et al. 2007).

No ambiente aquático, o Cromo existe como cromato e é assimilado pelo fitoplâncton. O cromato está no estado de oxidação hexavalente e, sob condições reduzidas de oxigênio, pode transformar-se em  $\text{Cr}^{3+}$ . Contudo, o  $\text{Cr}^{6+}$  é o tipo predominante em águas marinhas, por ser geralmente estável devido às condições elevadas de oxidação do meio, podendo ser acumulado nas espécies aquáticas por difusão passiva. Dessa maneira, no ambiente aquático pode ocorrer a bioacumulação desse metal, pois esse elemento quando liberado, como resultado de atividades industriais, dissolvido, suspenso na água ou contido no sedimento, é absorvido pelos organismos, particularmente os peixes pelas brânquias e pelo trato digestivo (Miranda et al., 2011). O efeito de bioacumulação é caracterizado pelo acúmulo de compostos, que não se integram às vias metabólicas orgânicas, ocasionando uma amplificação da concentração de tais compostos nos tecidos do organismo (Aguiar et al., 2002).

Esse trabalho consiste, em uma primeira etapa, na análise da assimilação de Cromo por peixes dulcícolas da ictiofauna brasileira, popularmente denominados como Tambaquis (*Colossoma macropomus*), por meio da exposição à diferentes concentrações de  $\text{Cr}^{6+}$  na forma de dicromato de potássio dissolvido em água, visando estabelecer uma relação de proporcionalidade entre a assimilação e a retenção do Cromo nos animais com a concentração e o tempo de exposição. Com a identificação dessa proporcionalidade estabelecer a viabilidade da análise dos

tambaquis (*Colossoma macropomus*) para diagnóstico e ou controle da contaminação por Cromo.

Em uma segunda etapa, o experimento visa identificar possíveis alterações histológicas provocadas pela exposição dos animais ao Cromo hexavalente por meio da análise histológica de brânquias, pele e fígado dos peixes utilizados no experimento. Por fim, a terceira etapa do presente estudo visa determinar a concentração letal para 50% de uma população de exemplares juvenis de Tambaquis (*Colossoma macropomus*), exposta ao Cromo hexavalente por 96 horas, considerada como uma contaminação aguda para peixes.

Dessa forma a execução deste trabalho busca contribuir, de forma significativa, para o esclarecimento dos efeitos do Cromo sobre peixes de água doce, no estabelecimento de parâmetros para riscos ambientais, além de avaliar como a contaminação por esse metal influencia na qualidade da água e conseqüentemente na saúde da ictiofauna.

O animal escolhido para este trabalho é dulcícola e natural dos leitos aquáticos amazônicos, sendo, inclusive, criados em viveiros e explorados comercialmente na pesca esportiva em pesqueiros ou como alimento em peixarias e supermercados de todo o país.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi identificar a existência de proporcionalidade na assimilação de Cromo hexavalente por exemplares juvenis de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) em exposição a diferentes concentrações, para três intervalos de tempo de contaminação, bem como identificar possíveis alterações histológicas e determinar a concentração letal de Cromo hexavalente para 50% da população exposta.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a assimilação e retenção do Cromo por exemplares juvenis de *Colossoma macropomum* em exposição às concentrações de 0,05 mg/L, 0,5 mg/L e 5 mg/L de (Cr<sup>+6</sup>).
- Verificar a relação de proporcionalidade entre a quantidade de Cromo assimilada e retida nos tecidos dos animais tratados com a concentração ambiental e o tempo de exposição.
- Identificar, por análise histológica, possíveis alterações na morfologia de brânquias, fígado e pele dos animais expostos, por meio de parâmetros quantitativos e qualitativos.
- Determinar a concentração de Cromo hexavalente (dicromato de potássio) dissolvido em água, suficiente para provocar a morte de 50 % da população de exemplares juvenis de *Colossoma macropomum* (CL<sub>50</sub>).

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

O Brasil é o país que apresenta a maior quantidade de água doce superficial do mundo e, dessa forma, apresenta uma biodiversidade invejável, tanto em ambientes naturais como em ambientes antrópicos como lagos de pesqueiros, fazendas, clubes e represas de hidrelétricas. Os ambientes aquáticos superficiais são alvos comuns de vários tipos de poluentes químicos provenientes de ambientes domésticos e/ou industriais, além de escoamentos urbanos e agrícolas (Dornfeld, 2006).

O quadro I relaciona os principais impactos das atividades humanas nos ecossistemas aquáticos e valores/serviços dos recursos hídricos em risco.

Quadro I: Relação entre a atividade humana e seus impactos nos ecossistemas aquáticos

<b>Atividade Humana</b>	<b>Impacto nos ecossistemas aquáticos</b>	<b>Valores/serviços em risco</b>
Construção de represas	Altera o fluxo dos rios e o transporte de nutrientes e sedimento e interfere na migração e reprodução de peixes.	Altera habitats e a pesca comercial e esportiva. Altera os deltas e suas economias.
Construção de diques e canais	Destrói a conexão do rio com as áreas inundáveis.	Afeta a fertilidade natural das várzeas e os controles das enchentes.
Alteração do canal natural dos rios	Danifica ecologicamente os rios. Modifica os fluxos dos rios.	Afeta os habitats e a pesca comercial e esportiva. Afeta a produção de hidroeletricidade e transporte.
Drenagem de áreas alagadas	Elimina um componente-chave dos ecossistemas aquáticos.	Perda de biodiversidade. Perda de funções naturais de filtragem e reciclagem de nutrientes. Perda de habitats para peixes e aves aquáticas.
Desmatamento do solo	Altera padrões de drenagem, inibe a recarga natural dos aquíferos, aumenta a sedimentação.	Altera a qualidade e a quantidade da água, pesca comercial, biodiversidade e controle de enchentes.
Poluição não controlada	Altera a qualidade da água.	Altera o suprimento de água. Aumenta os custos de tratamento. Altera a pesca comercial. Diminui a biodiversidade. Afeta a saúde humana.

<b>Atividade humana</b>	<b>Impacto nos ecossistemas aquáticos</b>	<b>Valores/serviços em risco</b>
Remoção excessiva de biomassa	Diminui os recursos vivos e a biodiversidade.	Altera a pesca comercial e esportiva. Diminui a biodiversidade. Altera os ciclos naturais dos organismos.
Introdução de espécies exóticas	Elimina espécies nativas. Altera ciclos de nutrientes e ciclos biológicos.	Perda de habitats e alteração da pesca comercial. Perda da biodiversidade natural e estoques genéticos.
Poluentes do ar (chuva ácida) e metais pesados	Altera a composição química de rios e lagos.	Altera a pesca comercial. Afeta a biota aquática. Afeta a recreação. Afeta a saúde humana. Afeta a agricultura.
Mudanças globais no clima	Afeta drasticamente o volume dos recursos hídricos. Altera padrões de distribuição de precipitação e evaporação.	Afeta o suprimento de água, transporte, produção de energia elétrica, produção agrícola e pesca e aumenta enchentes e fluxo de água em rios.
Crescimento da população e padrões gerais do consumo humano	Aumenta a pressão para construção de hidroelétricas e aumenta a poluição da água e a acidificação de lagos e rios. Altera os ciclos hidrológicos.	Afeta praticamente todas as atividades econômicas que dependem dos serviços dos ecossistemas aquáticos

Fonte: (Tundisi, 2003).

Desde o domínio dos elementos naturais para a confecção de artefatos para a utilização humana, o homem e o ambiente vêm entrando em contato com os metais, por exemplo, há milênios a. C., através da fusão da prata, metal considerado nobre pelo homem, eram liberadas grandes quantidades de Chumbo como subproduto, possibilitando, a partir desse momento, a utilização pelo homem desse material (Aceituno, 2002).

Dentre os metais, os considerados como pesados, podem ser encontrados em ambientes naturais, porém os que mais preocupam hoje são os liberados por atividades antrópicas. Essas estruturas químicas não apresentam origem em ambientes orgânicos, sendo, em grande parte das vezes, de difícil metabolização e eliminação por esses ambientes, desta forma se tornam uma das principais preocupações com relação à contaminação de ambientes e/ou alimentos. Tendo em vista a diversidade encontrada nos tipos de relação entre os metais pesados e os organismos, estabeleceu-se uma interessante classificação.

Os metais pesados necessários aos seres vivos, por eles utilizados, sendo trabalhados pelos organismos de forma relativamente eficiente e de baixo risco ambiental, podem ser classificados como elementos essenciais. Os elementos desse grupo, que são utilizados por seres vivos, mas que são considerados como de risco considerável à saúde dos seres vivos e também como contaminantes ambientais, podem ser classificados como elementos essenciais e simultaneamente micro contaminantes. (Nakano e Avila-Campos, 2002)

Os elementos de rara utilização pelos organismos, muitas vezes de uso específico associado a determinados seres vivos apenas, sendo encontrados na maioria dos outros seres em níveis considerados como traços não utilizáveis e ainda considerados como preocupantes em relação à contaminação ambiental, principalmente em ambientes aquáticos, são classificados como elementos micro contaminantes. (Nakano e Avila-Campos, 2002)

Os metais classificados como essenciais, essenciais e simultaneamente micro-contaminantes e micro-contaminantes ambientais são, de acordo com Nakano e Avila-Campos, 2002

- elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio;
- elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: Cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel
- micro-contaminantes ambientais: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio (Nakano e Avila-Campos, 2002).

Os efeitos tóxicos encontrados nos seres contaminados podem ser diretos e agudos como é o caso da anúria e diarreia sanguinolenta relacionada à contaminação por Mercúrio ou ainda pode se apresentar de forma “silenciosa”, ou seja, de forma lenta, aparecendo a médio e longo prazos, associados ao acúmulo do contaminante nos organismos. Essa talvez seja a preocupação ecológica mais importante, pois a manifestação, no primeiro caso, é evidente e rápida, determinando a identificação imediata do problema ambiental, enquanto no segundo caso, não aponta de forma clara e rápida sendo, muitas vezes, assintomática ou subclínica na população envolvida. (Nakano e Avila-Campos, 2002)

Os problemas encontrados nos organismos contaminados dependem das propriedades tóxicas do metal, da concentração adquirida na contaminação, ou

ainda, a concentração atingida pela bioacumulação. Os indivíduos podem reagir mais positivamente ou mais negativamente de acordo com as condições físicas apresentadas ou com a idade do indivíduo contaminado. Crianças e idosos tendem a apresentar níveis mais graves de sintomas em contaminações pela maioria dos metais (Nakano e Avila-Campos, 2002).

Os procedimentos de prevenção e controle da contaminação por metais nos mananciais hídricos passam por vários métodos e/ou condutas, como medidas que envolvem a saúde ocupacional e a monitoração direta do leite aquático. Hoje métodos alternativos estão se tornando opções reais e eficazes, como a biomonitorização, que tem sido utilizada como indicador biológico de exposição. Toda substância ou seu produto de biotransformação, ou qualquer alteração bioquímica observada nos fluídos biológicos, tecidos ou ar exalado, mostra a intensidade da exposição e/ou a intensidade dos seus efeitos (Nakano e Avila-Campos, 2002).

### **3.1. Características químicas e aplicações do Cromo.**

O Cromo (ou Crômio) é um metal pesado, classificado como do grupo de transição, associado a muitas atividades industriais atuais. Suas características químicas são:

*Símbolo: Cr*

*Número atômico: 24*

*Número de massa: 52*

*Configuração eletrônica:  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^4 4s^2$*

*Densidade: 7,140 g/cm<sup>3</sup>*

*Ponto de Fusão (PF): 2180,0 K*

*Ponto de Ebulição (PE): 2944,0 K*

*Sólido em temperatura ambiente.*

O Cromo tem seu maior estado de oxidação na forma hexavalente (+6) e o estado de maior estabilidade na forma, trivalente (+3). O principal mineral é a cromita (cromato de ferro,  $FeCr_2O_4$ ). A África do Sul é o maior produtor desse minério, com cerca de 75% do total mundial. Outro mineral, pouco comum, é a crocoíta (cromato de chumbo,  $PbCrO_4$ ). (CROMO – Laboratório virtual de Química-UNESP, 2015). Dentre as principais aplicações do Cromo, destacam-se:

- Usado para endurecer o aço, na produção de aços inoxidáveis e em muitas outras ligas (para resistências elétricas, por exemplo).
- Como camada superficial, produz uma superfície dura, de bom aspecto e resistente à corrosão.
- Revestimento de peças decorativas.
- Indústria coureiro-calçadista
- Ao vidro, dá uma cor verde-esmeralda. Também usado como catalisador.
- O dicromato, como o de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), é usado como agente oxidante em análises e também para colorir o couro.
- Cromato de chumbo é amarelo e é usado como pigmento.
- Compostos de Cromo também são usados como fixadores de cor na indústria têxtil e para anodizar o alumínio.
- A Cromita é usada para produzir tijolos refratários considerados neutros, isto é, que não reagem com sílica e outros refratários. (CROMO – Laboratório virtual de Química- UNESP, 2015).

A concentração permitida para o Cromo hexavalente em ambiente aquático, que apresente níveis de qualidade classe 1 e 2 e a permitida para padrões de lançamento de efluentes, são definidas por resoluções do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).

A Resolução CONAMA nº 357/2005 determina como concentração máxima para o Cromo hexavalente em leitos de águas doces classificados por classe 1 e classe 2, a concentração de 0,05 mg/L  $Cr^{+6}$ . (CONAMA, 2005)

A Resolução nº CONAMA 430/2011 determina como concentração máxima para o Cromo hexavalente em lançamento de efluentes, a concentração de 0,1 mg/L  $Cr^{+6}$ . (CONAMA, 2011)

### **3.2. Ecotoxicologia**

A Ecotoxicologia é o ramo da ecologia voltado para a análise do comportamento e das transformações que agentes químicos apresentam quando em ambientes ou em organismos vivos (Lofrano et al., 2015).

O ambiente tratado com ênfase por esse ramo da ecologia é o ambiente das águas superficiais. Esses leitos são depositários, além de substâncias recebidas naturalmente, de outras provenientes do ar, do solo e de outros afluentes já

contaminados. Os componentes podem ser encontrados em suas formas originais ou transformados (Bertoletti, 1990).

Dessa forma, os testes de toxicidade realizados com organismos oriundos de águas continentais, estuarinas e marinhas em ambientes laboratoriais ou em campo se tornaram fundamentais para a determinação dos efeitos promovidos por substâncias exógenas recebidas por esses leitos sobre a biota aquática. Também é alvo desses testes a identificação de limites permissíveis para as substâncias químicas testadas, além de permitir análise de impactos ambientais e orgânicos de misturas entre as diversas substâncias testadas isoladamente (Bertoletti, 1990).

O avanço tecnológico e industrial possui uma relação íntima com a utilização de minerais, porém esses mesmos minerais, quando liberados em grande quantidade no meio ambiente são considerados como fontes poluidoras do mesmo (Cotta et al., 2006). Dentre essas substâncias, os metais, principalmente os metais considerados como metais pesados merecem um grau relevante de preocupação, principalmente pelo fato de não serem degradáveis a curto prazo, permanecendo longos períodos no ambiente contaminado (Cotta et al., 2006).

Os metais ocorrem de forma natural em ambientes aquáticos, pois esses elementos são desagregados de rochas que os contêm, porém as atividades antropogênicas associadas ao uso desses elementos podem alterar enormemente os ciclos biogeoquímicos naturais dos mesmos em corpos hídricos (Salomons et al., 1995).

Os peixes presentes em um leito aquático contaminado estão em contato direto com o agente contaminante e esse fator acentua a possibilidade de contaminação pelo elemento químico. Quando um elemento químico é absorvido por um organismo e sua eliminação se efetua em velocidade inferior à velocidade de absorção, ocorre um processo de bioacumulação. As principais vias de acesso ao organismo de um peixe pelo elemento contaminante são as brânquias, o tegumento e pela alimentação (Gomes e Sato, 2011). Os metais pesados podem ser detectados em processos de bioacumulação em peixes, mesmo quando esses contaminantes se encontram em baixas concentrações no ambiente aquático (Machado et al, 2002). Em peixes a presença de metais pesados em concentrações consideráveis pode causar danos no crescimento e na reprodução dos animais, além de mudanças histopatológicas detectáveis em pele, brânquias, fígado e rins (Vitek et al., 2007). A bioacumulação ocorrida pela absorção do elemento

diretamente do meio é classificada como bioacumulação direta ou bioconcentração, enquanto que o fenômeno de biomagnificação é estabelecido pelo uso de componentes de outros níveis tróficos como itens alimentares em uma cadeia trófica (Pain, 1995).

Os peixes são organismos capazes de bioconcentrar metais pesados e compostos orgânicos, sendo utilizados para o monitoramento da poluição em ambientes costeiros (Curtis et al., 2003). Desta forma, podem ser utilizados como bioindicadores eficientes para monitoramento de leitos aquáticos. As espécies bioindicadoras são normalmente as escolhidas devido a sua sensibilidade ou tolerância a tipos diversos de alterações ambientais, causadas principalmente por ações antropogênicas, como poluição orgânica, assoreamento, construção de barragens, pesca predatória entre outros (Washington, 1984; Agostinho et al., 2005)

Outro aspecto importante na escolha do uso de peixes como bioindicadores se deve ao fato desses animais serem importantes fontes de proteína animal para a alimentação humana, além de estarem distribuídos em vários níveis tróficos nas teias alimentares, sendo, portanto, verdadeiros veículos de transferência de contaminantes dos ambientes para os organismos humanos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

Os critérios geralmente utilizados para a seleção de peixes para a utilização em experimento com espécies bioindicadoras são: serem espécies taxonomicamente bem definidas e facilmente reconhecíveis por não especialistas; ter distribuição geográfica ampla, ser abundante ou de fácil coleta, preferencialmente apresentarem tamanho médio/grande, apresentarem baixa mobilidade e longo ciclo de vida, dispor de características ecológicas conhecidas e apresentarem possibilidade de estudos em laboratórios (Freitas e Siqueira-Souza, 2009).

Na análise de bioindicadores expostos a contaminantes em ambientes aquáticos alguns aspectos são relevantes, sendo as duas características mais importantes: a) permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; e b) possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de bioindicadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (Arias et al., 2007; Lins et al., 2010).

Um outro conceito importante em estudos relacionados com contaminantes químicos em meios aquáticos é o conceito de biomarcadores, esses são representados pelas evidências de alterações biológicas como consequência a exposição a agentes estressores. Podem ser evidenciados em alterações comportamentais, bioquímicas, celulares, histológicas ou fisiológicas (Depledge, 1992). O uso de biomarcadores está intimamente associado com a Ecotoxicologia (Chapman, 2002). Os biomarcadores apresentam características que possibilitam a identificação dos resultados da interação entre os contaminantes e os organismos vivos que a eles estiveram expostos (Jesus e Carvalho, 2008; Repula et al., 2012).

### **3.3. Características morfológicas das brânquias, pele e fígado de Tambaquis (*Colossoma macropomum*)**

A maioria dos peixes teleósteos, como é o caso dos Tambaquis, possuem em cada lado da faringe, 4 arcos branquiais. Cada arco, por sua vez, é constituído por duas fileiras de filamentos branquiais. De ambos os lados de cada filamento se projetam as lamelas secundárias, revestidas por epitélio respiratório (Meletti, 2003). Os filamentos branquiais, ou lamelas primárias, possuem um suporte de cartilagem hialina, um sistema vascular e um epitélio de revestimento (Meletti, 2003).

O fígado de peixes é formado por cordões de hepatócitos que se anastomosam e convergem para veias centrais, formando lóbulos hepáticos. Entre os cordões dos hepatócitos são encontrados capilares sanguíneos do tipo sinusóides, fato que é justificado pelo alto metabolismo característico dos hepatócitos (Meletti, 2003).

A pele dos Tambaquis é formada por uma camada epitelial, a epiderme, apoiada sobre a derme, constituída de tecido conjuntivo denso. Na pele são encontrados os cromatóforos, células responsáveis pela cor da pele.

### **3.4. Influência do Cromo sobre sistemas biológicos**

Os metais pesados, apesar de ocorrerem naturalmente no ambiente e de alguns serem considerados elementos essenciais aos processos biológicos (por exemplo, ferro, cobre, zinco e cobalto), podem ser tóxicos quando em concentrações elevadas (Kennish, 1991; Heath, 1995; Dallinger e Raimbow, 2003). Dentre os

metais avaliados na indução de alterações histopatológicas em peixes estão o cloreto de mercúrio (Handy e Penrice, 1993; Dias et al., 2007), o mercúrio (Cardoso, 2006), zinco (Abdel-Warith et al., 2011), o cloreto de níquel (Athikesavan et al., 2006) e o nitrato de chumbo (Khan et al., 2011).

O Cromo é um metal importante em alguns processos metabólicos e fisiológicos, sendo o Cromo trivalente ( $\text{Cr}^{+3}$ ) a forma mais útil às funções orgânicas, considerado como um micronutriente necessário para atividade metabólica da insulina (Anderson, 1981). Já na forma hexavalente ( $\text{Cr}^{+6}$ ) o Cromo é bem mais tóxico que a forma trivalente ( $\text{Cr}^{+3}$ ) (Lushchak et al., 2009), podendo apresentar efeito carcinogênico no sistema digestório de mamíferos (Haney Jr, 2015). O Cromo hexavalente causa reversíveis e irreversíveis lesões em diferentes órgãos como brânquias, fígado e rins de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), expostos a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de dicromato de potássio por 96 horas, podendo afetar o funcionamento normal desses órgãos (Castro et al., 2013).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório multidisciplinar (Zoologia, Fisiologia e Farmacologia) do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, São Paulo. As instalações foram escolhidas devido às suas dimensões e adequações para o manuseio de animais experimentais. Para o recebimento da população a ser utilizada nos experimentos foi preparada um reservatório d'água de polietileno, com capacidade para 250 L. Os reservatórios d'água foram preenchidos com água previamente desclorada com o uso de (removedor Prime da Seachem Laboratories INC. Madison, GA 30650,USA) na dose de 50 mL para 2000 L – 2 gotas para 4 litros) (Figura 1 C). No reservatório foram adaptados mecanismos para aeração e filtragem externas, bem como bombas de aeração submersas, para o fornecimento de uma concentração de oxigênio dissolvido (OD) acima de  $5 \text{ mg/L}^{-1}$  (ABNT 2011, NBR 15088) apropriada para a população de animais experimentais.

Durante o período de aclimação, foram realizadas análises da água do reservatório para a coleta dos dados e análise de parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Os valores de temperatura e de pH, entre 6,5 e 7,5 (ABNT 2011, NBR – 15088) foram determinados em aparelho eletrônico tipo pHmetro, modelo mPA-210 da Ms Tecnopon Equipamentos Especiais LTDA (Figura 1A) e os dados referentes às concentrações de oxigênio dissolvido obtidos por teste químico colorimétrico LabconTest da Alcon Ltda (Figura 1B). A análise foi realizada por meio de comparação da cor da solução, usando escala fornecida pelo fabricante do produto. O levantamento desses parâmetros teve como objetivo o acompanhamento das condições ambientais e a identificação de possíveis correções, bem como a busca de valores mais aproximados possíveis entre os ambientes de origem e de destino, no processo de transferência dos animais.

FIGURA 1: Equipamentos e produtos utilizados na análise de parâmetros ambientais. A: pH, B: Teste para O<sub>2</sub> dissolvido LabconTeste e C: Removedor de cloro Prime.

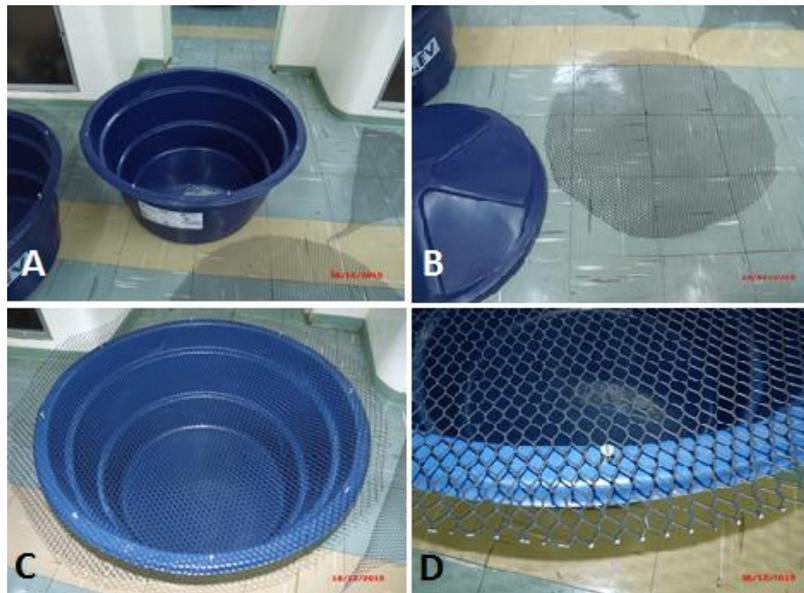


Sobre a caixa d'água foi estendida uma tela plástica de trama larga, como impedimento de possíveis perdas de animais para fora do reservatório em prováveis saltos (Figura 2). Para a realização das exposições ao Cromo foram disponibilizadas quatro caixas semelhantes à utilizada na aclimatação, porém com capacidade para 150 L d'água, onde as populações controle e testes foram colocadas durante a execução dos experimentos. Esses ambientes também receberam bombas de aeração submersas para a oxigenação da água e telas semelhantes à utilizada na caixa de aclimatação (Figura 3). Durante os dias em que os peixes ficaram expostos às diferentes concentrações do dicromato de potássio foram medidos o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido na água dos reservatórios

FIGURA 2: A: Caixa de polietileno FORTLEV - 250 L para aclimatação dos animais, B: Disposição da caixa de aclimatação no laboratório, C: Visão superior (observação do filtro externo e de bomba de aeração submersa), D: Detalhe do filtro externo.



FIGURA 3: Caixas para a realização do experimento. A: Caixa de polietileno FORTLEV para 150 L B: Preparação da tela de proteção, C: Caixa de polietileno com a tela, D: Sistema de fixação da tela protetora.



#### 4.1. Acclimação e preparo dos aquários para os espécimes

Os animais experimentais, espécimes jovens de Tambaquis (*Colossoma macropomus*), com aproximadamente 9 cm de comprimento e oriundos de uma mesma desova realizada exclusivamente para esse fim, foram comprados na piscicultura Santa Cândida, município de Santa Cruz da Conceição – SP (Figura 4). Os exemplares foram transportados em recipientes plásticos, fornecidos pela piscicultura e apropriados para o deslocamento desse tipo de animais, de coloração âmbar e parcialmente preenchidos por água do próprio ambiente de origem dos peixes.

Os exemplares foram selecionados por funcionários da piscicultura, buscando uma homogeneização de tamanho das populações coletadas e transferidos para o interior dos recipientes, que foram então insuflados com ar comprimido, preenchendo o espaço restante, e então lacrados por técnica de amarração executada pela piscicultura, evitando assim abertura dos recipientes durante o transporte. O traslado se deu de forma relativamente tranquila até o ambiente de realização do experimento.

Os sacos de transporte foram acomodados no reservatório de recebimento e acclimação em água previamente passada por processo de descloração, aeração e controle térmico, como descrito anteriormente. Além disso, foi realizado um processo de desenvolvimento de microbiota apropriada, pela introdução prévia de quantidade adequada de matéria orgânica, orientado por profissionais de piscicultura. Os recipientes de transporte foram deixados ali até a equiparação da temperatura da água presente no interior dos recipientes de transporte com a temperatura da água existente na caixa d'água de recebimento e acclimação, por aproximadamente 40 minutos.

A partir dessa etapa os sacos foram abertos e emborcados lentamente para o contato gradual dos ambientes até a transferência completa do conteúdo do recipiente de transporte para o reservatório de acclimação. A etapa de transporte e transferência dos animais transcorreu com sucesso total, não sendo observada nenhuma perda de exemplares, fato comum observado nesse tipo de transferência de peixes.

FIGURA 4: Piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP.



O período de aclimação a que a população foi exposta no ambiente inicial foi de quinze dias (Castro, 2014). Durante esse período, os peixes foram mantidos no reservatório, sendo o monitoramento da temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido realizados diariamente. Durante o período de aclimação, quatro reservatórios d'água de polietileno, com capacidade para 150 L d' água, foram lavados e preparados para a instalação de bombas para aeração (Figura 5), telas plásticas para cobertura e posicionados em área predeterminada para o experimento, onde receberam água, seguido do tratamento de descloração, as caixas d'água permaneceram por dois dias para análise da estabilização das condições de pH, temperatura e oxigênio dissolvido.

FIGURA 5: Bomba de aeração submersa com ventosas.



#### **4.2. Preparo dos ambientes de exposição ao Cromo hexavalente.**

Para a execução do experimento foram preparados os reservatórios para o recebimento dos animais, sendo um ambiente controle, somente com a água, e três ambientes para a exposição dos animais ao Cromo hexavalente nas concentrações de 0,05 mg/L, 0,5 mg/L e 5 mg/L. O preparo das diluições foi realizado pela relação massa por volume adequada a cada concentração teste (0,05 mg/L, 0,5 mg/L e 5 mg/L). O dicromato de potássio, pesado em balança analítica e dissolvido em água desclorada em proveta de dois litros, foi transferido para o respectivo reservatório e devidamente homogeneizado antes da transferência dos animais.

#### **4.3. Transferências de espécimes para o ambiente do experimento**

A transferência foi realizada visando o mínimo estresse aos animais, tanto em relação à movimentação, quanto em relação às diferenças ambientais, ambiente de origem em relação ao ambiente de teste. Para esse fim foi utilizado um coletor apropriado de boca larga (aproximadamente 25 cm de comprimento por 20 cm de largura) com um receptáculo amplo de rede de náilon para a captura e contenção dos animais. A transferência foi realizada de forma relativamente rápida sem a necessidade de tempo de aclimação no ambiente destino, devido à equivalência dos fatores ambientais entre os ambientes. Esse fato foi comprovado pela

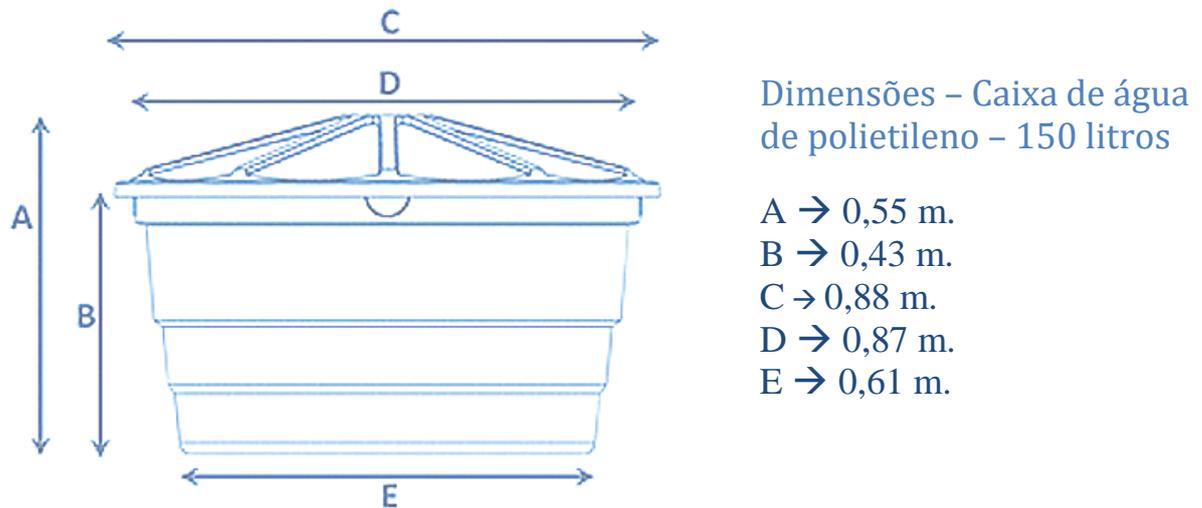
observação do comportamento dos animais após a transferência para o reservatório teste, onde os grupos acabaram se dispersando por todo o volume dos reservatórios, comportamento semelhante ao apresentado no reservatório de aclimação, com movimentação tranquila sem grande agitação, sendo a alimentação imediatamente reassumida no ambiente teste, fato que demonstra também ausência de estresse em criações de peixes.

A população transferida para os reservatórios destinados ao experimento consistia em dezesseis animais por reservatório (Controle, Tratado 01, Tratado 02 e Tratado 03), sendo quatorze peixes utilizados para a análise da absorção do Cromo pelos animais e dois peixes para a análise histopatológica em microscopia de luz para evidenciação de possíveis alterações dos aspectos histológicos provocadas pela exposição dos animais às concentrações testadas no experimento. A primeira etapa do experimento consistiu em exposições dos animais às concentrações pré-estabelecidas (Controle, Tratado 01: 0,05 mg/L; Tratado 02: 0,5 mg/L e Tratado 03: 5 mg/L) por período de cinco dias, na segunda etapa de exposição, às mesmas concentrações, se deu por dez dias e, na terceira e última etapa, a exposição se deu por quinze dias.

#### **4.4. Características das baterias de aquários utilizadas**

A bateria utilizada na experimentação foi composta por quatro reservatórios de polietileno para água domiciliar, com capacidade de 150 L cada (Figura 6). O preenchimento de cada reservatório, utilizado nas diferentes etapas do experimento foi de 144 litros, pois o volume máximo de 150 litros atingia praticamente a altura máxima do reservatório, aumentando as chances de extravasamento de água e de perda de espécimes por saltos, dentre outros problemas na condução segura dos testes.

FIGURA 6: Esquema ilustrativo com dimensões da caixa de água de polietileno para 150 litros da FORTLEV Fonte: <http://www.fortlev.com.br/produto/caixa-dagua-de-poli-etileno-2/>



A distribuição da bateria seguiu a seguinte ordem:

Grupo 1 – Controle.

Grupo 2 – Tratado 01 – Concentração de 0,05 mg/L (Cromo hexavalente)

Grupo 3 – Tratado 02 – Concentração de 0,5 mg/L (Cromo hexavalente)

Grupo 4 – Tratado 03 – Concentração de 5 mg/L (Cromo hexavalente)

Os animais foram expostos às respectivas concentrações por 5, 10 e 15 dias, sendo as condições ambientais como temperatura, luminosidade, oxigênio dissolvido e evaporação acompanhados durante toda a realização do experimento e corrigidas sempre que necessário. Após o período de exposição, os animais foram eutanasiados, com a dose letal de 125 mg/L de cloridrato de Benzocaína (Antunes et al., 2008) e preparados para a etapa de análise da concentração de Cromo.

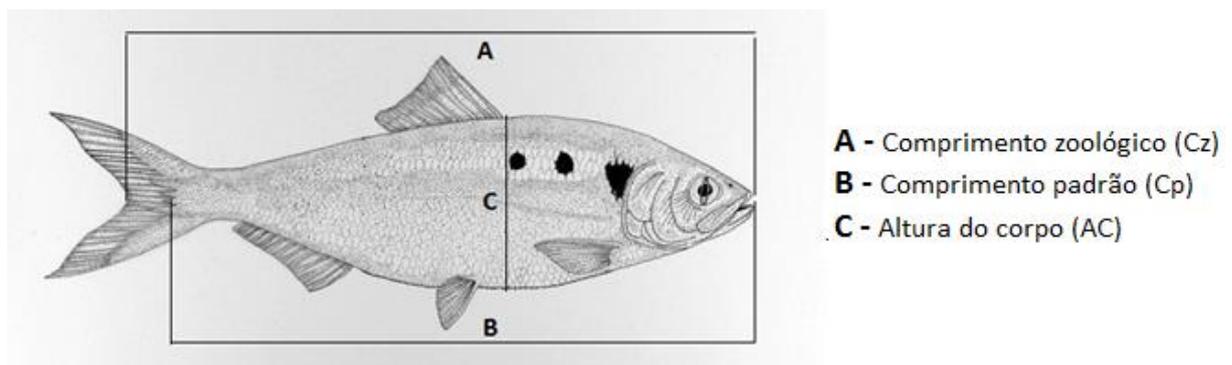
Fragmentos de brânquias, fígado e pele foram colhidos, fixados em formol e processados para análise histológica em microscopia de luz.

#### 4.5. Análise quantitativa da contaminação por Cromo

Após a eutanásia, os peixes foram pesados e medidos utilizando paquímetro para se obter as medidas compreendidas entre o início da cabeça e final de barbatana caudal (comprimento zoológico – Cz), início da cabeça até a inserção da nadadeira caudal (comprimento padrão – Cp) e Altura do corpo (AC). Como descrito anteriormente, dos dezesseis animais de cada grupo experimental, dois animais foram utilizados para a extração de fragmentos de brânquias, fígado e pele para a análise histológica e os outros quatorze animais foram colocados em sacos plásticos com dimensões adequadas para abrigar um espécime (uma unidade por animal sacrificado), previamente devidamente identificados, com as informações sobre o número do animal, a concentração de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e o período de exposição à contaminação a que o animal foi submetido no experimento. Em seguida, foram congelados e posteriormente encaminhados para o Laboratório de Química situado nas dependências da faculdade de Engenharia Química (bloco D) da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP para a realização da determinação da concentração de Cromo absorvida por cada espécime na massa seca total dos animais.

Figura 7 – Dados biométricos analisados nos peixes.

Adaptado de <http://pauloedita2.blogspot.com.br/2006/02/desenhos-de-peixes.html>



No laboratório, os peixes foram descongelados, individualizados, identificados e pesados, obtendo-se assim os valores referentes à massa úmida de cada animal. Após esse procedimento, iniciou-se o processo de secagem dos espécimes, agora acondicionados em cadinhos apropriados e colocados em estufa com temperatura de 80° C até a secagem total do material, aproximadamente 48 h de exposição

(Figura 7). Após o período de desidratação os espécimes e os cadinhos foram novamente pesados para a obtenção do peso total do conjunto (cadinho mais peixe); como a massa de cada cadinho já havia sido pré-determinada, essa massa foi descontada da massa total, conseguindo-se a massa seca de cada animal desidratado.

Após a etapa de desidratação dos espécimes foi realizada a etapa de digestão dos espécimes através da exposição a 50 ml de uma solução de ácido Nítrico P.A./ Perclórico P.A. 2:1 sob aquecimento, até atingir a completa digestão (dissolução total). Com a digestão o volume atingiu aproximadamente 25 ml e, nesse momento, o balão foi retirado para o resfriamento e foi realizado o acerto do volume para 50 mL com água ultra pura. Após a realização desses procedimentos foi realizada uma filtração em filtro qualitativo e o material foi encaminhado para a dosagem do Cromo total.

FIGURA 8: Secagem dos peixes em estufa. A: Interior da estufa para secagem dos peixes, B: Cadinhos com os peixes, C: Estufa para secagem dos peixes – vista geral.



A dosagem do Cromo foi realizada através da análise das amostras por espectrometria de absorção atômica em equipamento Perkin Elmer com lâmpada de cátodo oco para Cromo no método direto de chama ar-acetileno (Figura 8). A análise foi realizada em duplicatas com utilização de curva padrão construída a partir de soluções com padrões conhecidos de concentrações de Cromo (LDM 0,001 mg/L Cr).

FIGURA 9: Equipamento para análise por espectrometria de absorção atômica.



Os resultados foram devidamente identificados, dispostos em tabelas e plotados em gráfico para correlações entre os dados relacionados à contaminação dos animais.

A análise estatística foi realizada a partir dos dados obtidos através do teste Kruskal-Wallis, um teste não paramétrico, aplicado aos resultados obtidos em relação à absorção e retenção de Cromo pelos animais em cada período de exposição ao Cromo hexavalente (5, 10, 15 dias) no sentido de estabelecer o nível de significância dos valores apresentados.

#### **4.6. Análise histopatológica das brânquias, pele e fígado dos animais.**

Após a eutanásia dos animais por dose letal de 125 mg/L de cloridrato de Benzocaína (Antunes et al., 2008) foram realizadas a pesagem e medição dos animais experimentais e controle. Após esse processo foi realizada a extração de fragmentos de brânquias, fígado e pele de dois animais dos grupos Controle e Tratados 01, 02 e 03, dos grupos de 5, 10 e 15 dias de experimentação. Os fragmentos de tecidos foram imediatamente mergulhados em formol 10% tamponado e fixados por 24 horas. Após esse período os materiais foram processados para inclusão em parafina no laboratório de técnicas histológicas do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto (Figura 9).

Secções com 5 $\mu$ m de espessura foram dispostas em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e foram analisadas qualitativamente e quantitativamente em microscópio Nikon Eclipse E 200. (Figura 10).

FIGURA 10: Laboratório de técnicas histológicas . A: Visão geral B: Bateria para processamento e coloração (HE), C: Micrótomo, D: Lâminas confeccionadas.



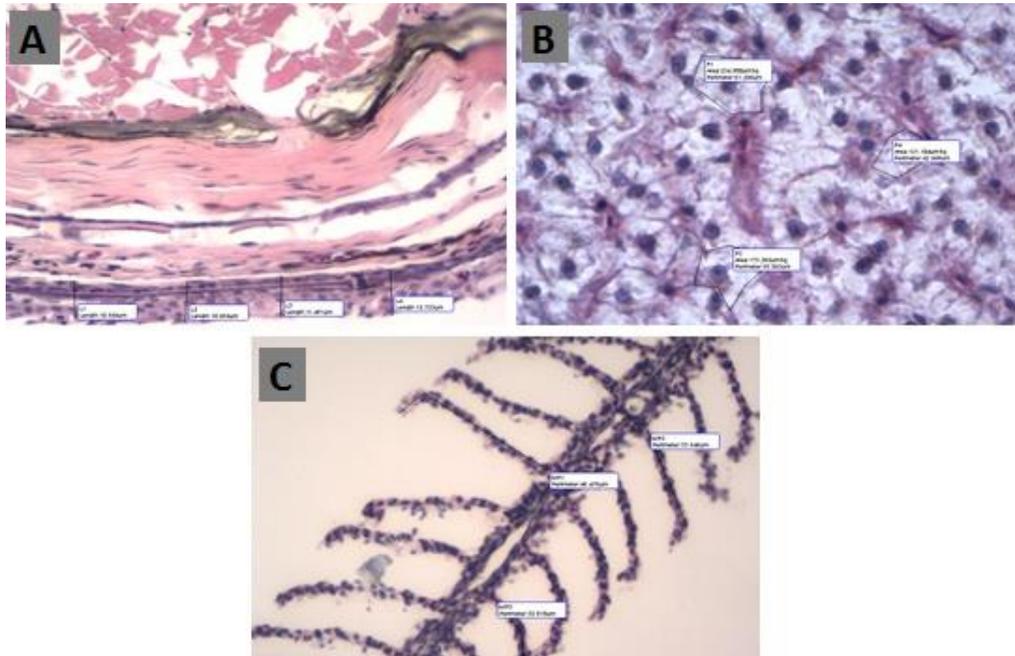
Para a análise qualitativa foram avaliados parâmetros referentes à arquitetura histológica normal dos órgãos em questão, tendo em vista o caráter mutagênico e carcinogênico do Cromo hexavalente (Miranda Filho et al., 2011).

A análise quantitativa foi realizada por meio de programa ICS Capture e avaliados os seguintes parâmetros: comprimento de 30 lamelas secundárias dos filamentos branquiais, espessura da epiderme e a área e o perímetro de 30 hepatócitos de cada animal (Figura 11).

FIGURA 11: Microscópio Nikon Eclipse E 200.



Figura 12: Cortes histológicos de pele, mostrando a medida da espessura da epiderme (A), fígado, com medida de área e perímetro dos hepatócitos (B) e comprimento das lamelas secundárias dos filamentos branquiais (C), utilizados para as análises qualitativas. Aumento total: 200X, coloração: Hematoxilina e Eosina (H-E)



As secções foram fotografadas utilizando de câmera Tucsen USB 2.0 H. Series, acoplada ao microscópio. (Figura 13)

FIGURA 13: Câmera Tucsen USB 2.0 H. Series



#### **4.7. Determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>) para peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) em contaminação aguda por Cromo hexavalente.**

Para a determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>) do Cromo hexavalente para peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) foi preparada, inicialmente, uma bateria composta por uma série de sete aquários contíguos, com capacidade máxima para sete litros de água ou solução cada um (Figura 14). Para a manutenção de uma temperatura homogênea nos aquários teste e controle a bateria possui uma seção única com capacidade de 20 litros de água, sem separações e situada na parte de trás dos aquários componentes da bateria, cujo conteúdo não apresenta contato direto com os conteúdos das unidades componentes da bateria. Nessa seção foi instalado um termostato *Hopar H-606 Aquarium Heater de 75 w* (Figura 15) para a manutenção da temperatura e transferência térmica para as unidades componentes da bateria.

FIGURA 14: Bateria para a exposição ao Cromo (seis animais). A: Detalhe da seção para manutenção e transferência de temperatura. B: Bateria em visão geral.



FIGURA 15: Termostato *Hopar H-606 Aquarium Heater* de 75 w



A bateria de aquários foi devidamente limpa e higienizada por meio de utilização de equipamentos de limpeza isentos de produtos químicos e posterior realização de sequência de preenchimentos com água desclorada, seguidos de drenagens consecutivas. Após os procedimentos de limpeza, os compartimentos foram preenchidos com água desclorada por um período de 24 horas para a observação e detecção de possíveis pontos de vazamentos.

Com a constatação da integridade da bateria, foram realizados testes para detecção de temperatura, pH e concentração oxigênio dissolvido no conteúdo das unidades componentes da bateria. Com a constatação de valores físico-químicos adequados alguns animais foram transferidos para os aquários, onde permaneceram por um período de dois dias para a observação de alterações de suas condições físicas e comportamentais relacionadas à exposição ao conteúdo dos aquários, sendo observados parâmetros como a coloração, movimentos respiratórios, atividade e posicionamento corporal.

Com as condições adequadas estabelecidas foi determinada uma concentração para a exposição inicial, com base em experiência anterior em um projeto piloto para servir como referência na condução de uma sequência de exposições. Cada etapa experimental era constituída por exposições dos animais ao Cromo hexavalente em ambiente aerado por ar insuflado através de extremidades porosas, por ação de bombas externas de aeração (Bomba Compressor Boyu S-2000a 2 saídas 110v), por um período de noventa e seis horas, com suspensão de alimentação. Cada aquário componente da bateria foi preenchido por um conteúdo composto por um terço de água transferida da caixa de aclimatação e dois terços por água previamente desclorada, até um volume de aproximadamente cinco litros.

#### **4.8. Preparo da bateria de aquários para exposição dos animais ao Cromo hexavalente**

O Cromo na forma de dicromato de potássio  $K_2Cr_2O_7$  (Dicromato de Potássio P.A – Cinética – Reagentes e Soluções) foi diluído para a composição de uma solução estoque utilizada como fonte de dosagens adequadas no preparo das soluções nos aquários de exposição dos exemplares em cada etapa do experimento. A transferência da solução de Cromo para os aquários foi realizada por pipetador automático eppendorf Research plus previamente regulado no volume adequado para a obtenção da concentração de exposição em cada unidade da bateria de aquários (exceção do aquário controle) por etapa do experimento, sendo então o volume dos aquários acertado para um total de seis litros por acréscimo de água desclorada. Após a transferência, a aeração da bateria foi ativada e a

superfície anterior bloqueada com folhas de papel sulfite, visando a redução do estresse dos animais experimentais e controle.

A bateria foi deixada sem os animais por um período de doze horas, buscando a estabilização e homogeneização da solução em cada unidade de exposição para o recebimento dos animais experimentais e controle. Após o período de homogeneização e estabilização, os animais foram então transferidos de caixas de aclimatação para os ambientes de exposição através de uma seleção no ambiente de origem, visando atingir o maior grau possível de equiparação nas dimensões dos animais por etapa do experimento. A transferência inicial dos exemplares foi realizada para um ambiente intermediário adequado ao transporte e obtenção de adequação térmica em relação à temperatura das unidades de exposição, permitindo assim uma transição menos estressante para a população experimental. A passagem dos animais, do ambiente intermediário para os aquários de exposição, foi realizada por rede de contenção e uso das mãos protegidas por luvas, de forma mais gradual possível.

Para as concentrações iniciais foi utilizada, em cada exposição, uma bateria de seis aquários para o estabelecimento da concentração correspondente à concentração letal para 50% da amostra ( $CL_{50}$ ). Cada aquário recebeu um animal por etapa do experimento, sendo seis animais em exposição à concentração experimental do Cromo hexavalente e um animal no ambiente controle. A sequência de concentrações de exposição ao Cromo hexavalente foi definida usando como referência o resultado de uma concentração inicial, a partir da qual as demais concentrações foram ajustadas.

FIGURA 16: Bateria inicial para o teste de seis animais e um animal controle.



Se a exposição a uma determinada concentração apresentasse como resultado uma porcentagem de óbitos de animais superior a 50% (mais que três peixes mortos) a próxima exposição era, conseqüentemente, ajustada para um valor menor que o utilizado anteriormente, sendo o valor do ajuste proporcional ao desvio observado em relação à concentração de referência. O inverso também foi considerado no método utilizado, ou seja, se o número de óbitos era menor que o esperado para a determinação da  $CL_{50}$ , a concentração era proporcionalmente aumentada.

Com a determinação da concentração aproximada para o estabelecimento da  $CL_{50}$  em bateria para exposição de seis animais, foi testada a mesma concentração, mas com o dobro da amostra, ou seja, 12 peixes por bateria de exposição ao Cromo hexavalente. O objetivo dessa expansão foi aumentar a população experimental e conseqüentemente aumentar a confiabilidade no resultado obtido, que passou para doze animais teste e um controle.

Para a expansão foram adquiridos mais seis aquários, com capacidade igual aos aquários constituintes da bateria inicial, dispostos em sequência em local próximo aos aquários iniciais, de forma a receberem as mesmas condições de ventilação e luminosidade que os aquários da bateria inicial. Os aquários adicionais foram inseridos em duas caixas plásticas preenchidas com água até o nível do volume utilizado nos aquários e com temperatura controlada por termostato para a manutenção das mesmas condições ambientes do experimento inicial. Foram acomodados três aquários dentro de cada caixa plástica, sendo devidamente

posicionados e nivelados, cada um recebendo uma extremidade porosa ligada a uma bomba de aeração externa (Figura 17).

FIGURA 17: Expansão da bateria para análise de doze animais teste e um controle.



Os procedimentos para o preparo dos ambientes de exposição ao Cromo e de transferência dos animais seguiram os utilizados para a bateria de seis componentes nas exposições iniciais.

Foram testadas as seguintes concentrações de Cromo hexavalente em bateria de 6 aquários: 25 mg/L, 27 mg/L, 28 mg/L e 30 mg/L. Como a bateria de 27 mg/L mostrou-se mais próxima da  $CL_{50}$ , foram repetidas as concentrações de 27 mg/L e 27,5 mg/L em bateria contendo 12 aquários teste e um aquário controle.

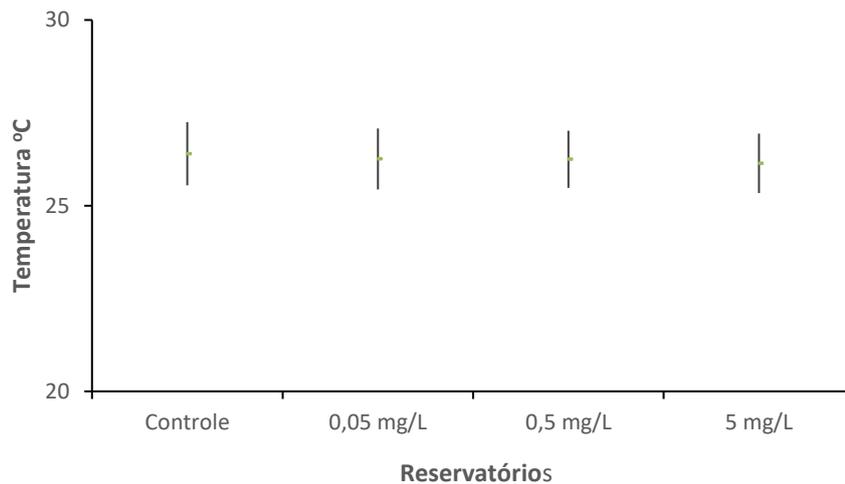
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura do ambiente externo durante todos os experimentos foi de  $26,8 \pm 1,1^\circ \text{C}$ . Já a umidade do ambiente externo, durante o experimento se manteve, em  $32\% \pm 7\%$ . Esses resultados se mostraram adequados à criação dos animais utilizados nos experimentos.

### 5.1. Dados relativos à água dos reservatórios

A temperatura da água manteve-se entre  $25,3^\circ \text{C}$  e  $27,3^\circ \text{C}$ , conforme apresentado na Figura 18. O desvio padrão manteve-se em torno de  $0,8^\circ \text{C}$ .

Figura 18: Representação da temperatura da água nos reservatórios durante os experimentos.



Na Tabela 1 estão apresentados os valores de pH obtidos no controle da água, a média e o desvio padrão.

Tabela 1 - pH da água dos reservatórios durante os experimentos

	Mínimo	Máxima	Média	Desvio Padrão
Controle	6,19	6,89	6,54	0,35
0,05 mg/L	6,43	6,95	6,69	0,26
0,5 mg/L	6,53	7,13	6,83	0,30
5 mg/L	6,58	7,26	6,92	0,34

O oxigênio dissolvido na água dos reservatórios durante os experimentos foi em média de 7,5 mg/L  $\pm$  1.

Os ambientes aquáticos dos reservatórios apresentaram parâmetros com valores adequados à manutenção das condições vitais dos animais, com o mínimo de estresse possível. Os valores encontrados para as concentrações de oxigênio dissolvido na água se mantiveram sempre acima de 6 mg/L (ABNT 2011), mostrando a adequação dos volumes dos reservatórios com as populações acondicionadas, bem como pouca influência de fatores debilitantes do oxigênio dissolvido, como a demanda bioquímica do oxigênio (DBO) ou demanda química de oxigênio (DQO).

## 5.2. Cromo total presente nos peixes nos períodos de 5, 10 e 15 dias.

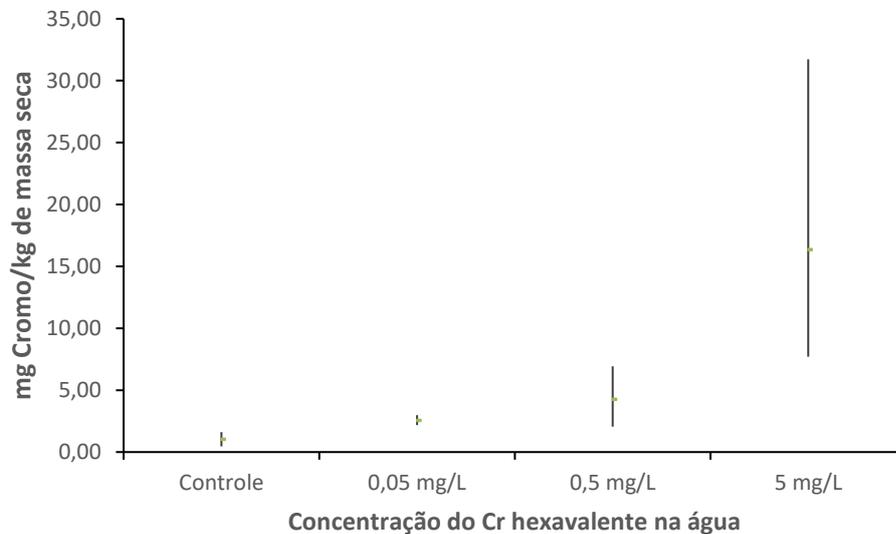
Após o cumprimento dos períodos de exposição, os animais foram eutanasiados, congelados e enviados ao Laboratório de Química do curso de Engenharia Química da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, onde foram preparados para a análise da absorção do Cromo em absorção atômica no método de chama.

Tabela 2 – Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de 14 peixes (Kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 5 dias.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão
<b>Controle</b>	0,46	1,62	1,03	0,25
<b>0,05 mg/L</b>	2,19	2,98	2,54	0,26
<b>0,5 mg/L</b>	2,06	6,93	4,25	1,37
<b>5 mg/L</b>	7,70	31,73	16,35	6,00

Para melhor visualização dos resultados construiu-se o gráfico da Figura 19.

Figura 19: Média e desvio padrão (n=14) da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 5 dias.



Os valores encontrados para a absorção de Cromo pelos exemplares juvenis de Tambaquis (*Colossoma macropomum*), expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente por um período de 5 dias, mostraram um padrão proporcional em relação aos graus crescentes de concentração a que foram expostos. Esses resultados apontam para a possibilidade de utilização desses exemplares como bioindicadores em análise da presença de Cromo em ambientes aquáticos, como esperado.

### 5.2.1 Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 5 dias.

Kruskal-Wallis test

P value < 0.0001 \*\*\*

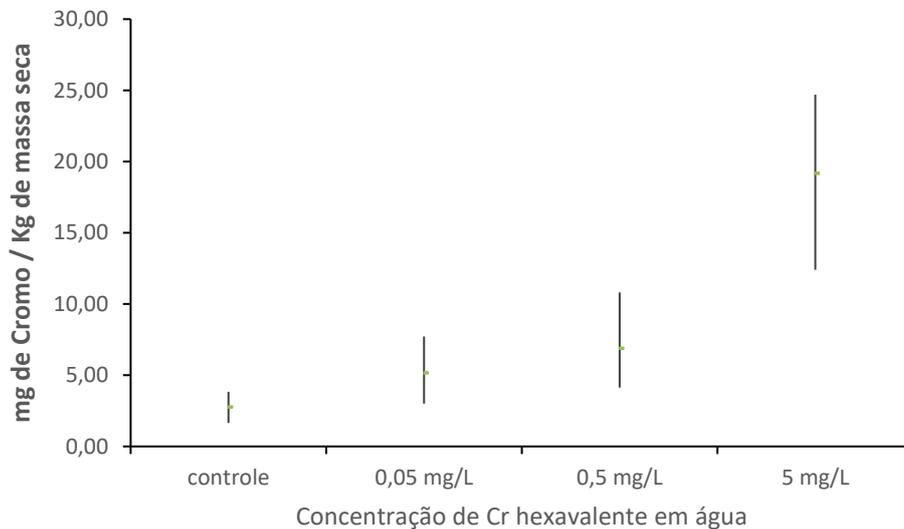
Dunn's Multiple Comparison Test	Significant? P < 0.05?	Summary
controle vs 0,05 mg/L	Yes	*
controle vs 0,5 mg/L	Yes	***
controle vs 5 mg/L	Yes	***
0,05 mg/L vs 0,5 mg/L	No	ns
0,05 mg/L vs 5 mg/L	Yes	***
0,5 mg/L vs 5 mg/L	Yes	*

p>0,05 ns / p<0,05 \* / p<0,01 \*\* / p<0,001 \*\*\*

Tabela 3 – Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de 14 peixes (Kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 10 dias.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Controle	1,65	3,84	2,76	0,8
0,05 mg/L	3,02	7,72	5,16	1,69
0,5 mg/L	4,14	10,82	6,88	2,17
5 mg/L	12,39	24,69	19,18	3,08

Figura 19: Média e desvio padrão (n=14) da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 10 dias.



Os valores encontrados para a absorção de Cromo pelos exemplares de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente por um período de 10 dias, repetiram a tendência encontrada na exposição por 5 dias, reforçando a possibilidade do estabelecimento do padrão proporcional em relação aos graus crescentes de concentração do Cromo hexavalente. Os valores encontrados no período de 10 dias também se mostraram superiores aos encontrados na exposição de 5 dias, indicando um aumento proporcional na absorção do Cromo também com o maior período de exposição.

### 5.2.2 Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 10 dias.

Kruskal-Wallis test

P value < 0.0001 \*\*\*

Dunn's Multiple Comparison Test	Significant? P < 0.05?	Summary
controle vs 0,05 mg/L	No	ns
controle vs 0,5 mg/L	Yes	**
controle vs 5 mg/L	Yes	***
0,05 mg/L vs 0,5 mg/L	No	ns
0,05 mg/L vs 5 mg/L	Yes	***
0,5 mg/L vs 5 mg/L	Yes	*

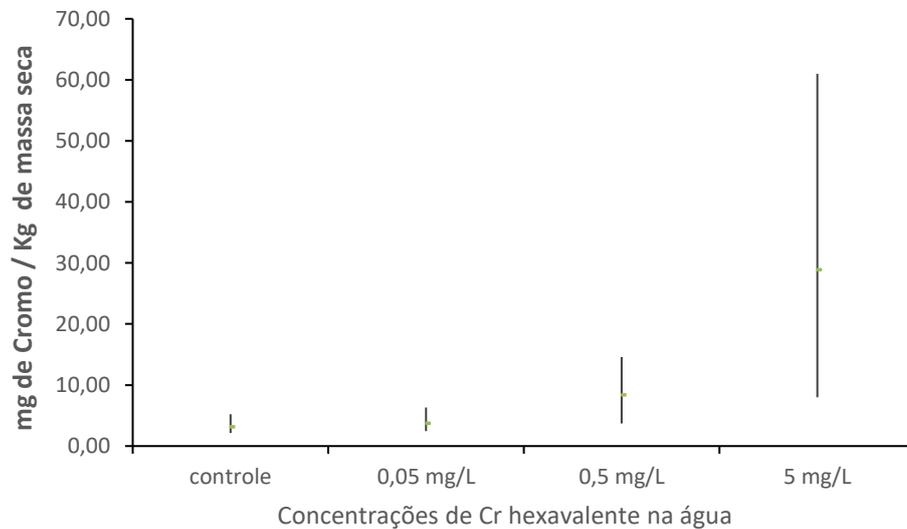
p>0,05 ns / p<0,05 \* / p<0,01 \*\* / p<0,001 \*\*\*

A Tabela 4 apresenta os resultados da massa de Cromo presente na massa seca dos animais submetidos por 15 dias em diferentes concentrações de Cromo (VI) na água.

Tabela 4 – Concentrações de Cromo total (mg) em massa seca de 14 peixes (Kg) submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 15 dias.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Controle	2,14	5,22	3,11	0,96
0,05 mg/L	2,46	6,34	3,71	0,98
0,5 mg/L	3,72	14,60	8,35	3,31
5 mg/L	7,98	60,99	28,85	12,93

Figura 20: Média e desvio padrão (n=14) da concentração de Cromo total presente na massa seca de peixes submetidos a diferentes concentrações de Cromo por um período de 15 dias.



Na análise da absorção do Cromo pelos exemplares juvenis de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente por um período de 15 dias, a relação de proporcionalidade entre os níveis de concentração de Cromo nos reservatórios e de Cromo absorvido pelos animais voltou a se apresentar, de forma a confirmar esse padrão. A relação com o tempo de exposição às concentrações também se confirmou nesse período de 15 dias, mostrando-se também um padrão.

### 5.2.3 Análise estatística dos dados referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente no período de 15 dias.

Kruskal-Wallis test

P value < 0.0001 \*\*\*

Dunn's Multiple Comparison Test	Significant? P < 0.05?	Summary
controle vs 0,05 mg/L	No	ns
controle vs 0,5 mg/L	Yes	**
controle vs 5 mg/L	Yes	***
0,05 mg/L vs 0,5 mg/L	Yes	*
0,05 mg/L vs 5 mg/L	Yes	***
0,5 mg/L vs 5 mg/L	No	ns

p>0,05 ns / p<0,05 \* / p<0,01 \*\* / p<0,001 \*\*\*

#### **5.2.4 Análise geral dos dados estatísticos referentes à exposição dos peixes às concentrações de Cr hexavalente nos períodos de 5, 10 e 15 dias.**

As análises estatísticas realizadas no método Kruskal-Wallis se basearam em testes comparativos entre os valores obtidos nas quatro amostras por período de exposição, sempre confrontando as exposições duas a duas, por exemplo, os valores da amostra obtida nos animais controle do período de 5 dias são comparados separadamente com as exposições de 0,05, 0,5 e 5 mg/L de Cromo absorvido pelos animais dessas amostras no mesmo período. Os valores obtidos nas comparações determinam o grau de significância para as amostras analisadas, sendo o valor de referência igual a 0,05; portanto valores iguais ou superiores a 0,05 indicam que o resultado não é significativo, enquanto que valores inferiores a 0,05 indicam resultados significativos e recebem sinais de \* indicando o nível de significância do valor encontrado, seguindo a seguinte referência: Valores inferiores a 0,05 recebem o sinal ( \* ), os valores inferiores a 0,01 recebem o sinal ( \*\* ) e os valores inferiores a 0,001 recebem o sinal ( \*\*\* ).

Com essas análises realizadas, o teste Kruskal-Wallis determina um índice de significância global para aquele período de exposição. Esse índice é denominado P value (P valor), que segue a mesma referência de valores citada acima.

Todos os períodos analisados nesse experimento obtiveram como resultados valores inferiores a 0,0001 para P valor, indicando um grau alto de significância para os resultados obtidos na análise quantitativa da absorção e retenção do Cromo hexavalente pelos animais testados.

### 5.3. Dados biométricos dos peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) utilizados nos experimentos realizados.

Figura 21 - Comprimento zoológico (Cz) de 14 peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 5 dias.

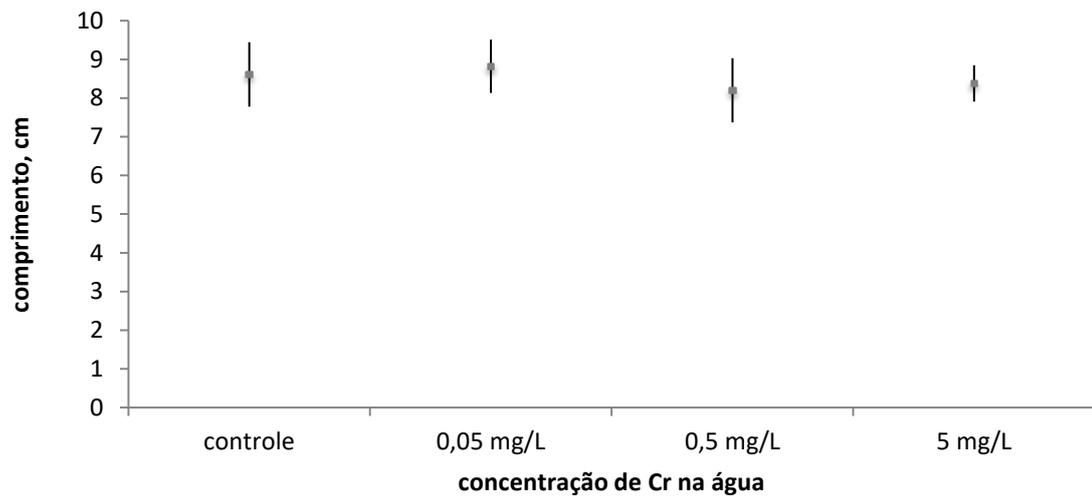


Figura 22 - Comprimento zoológico (Cz) de 14 peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 10 dias.

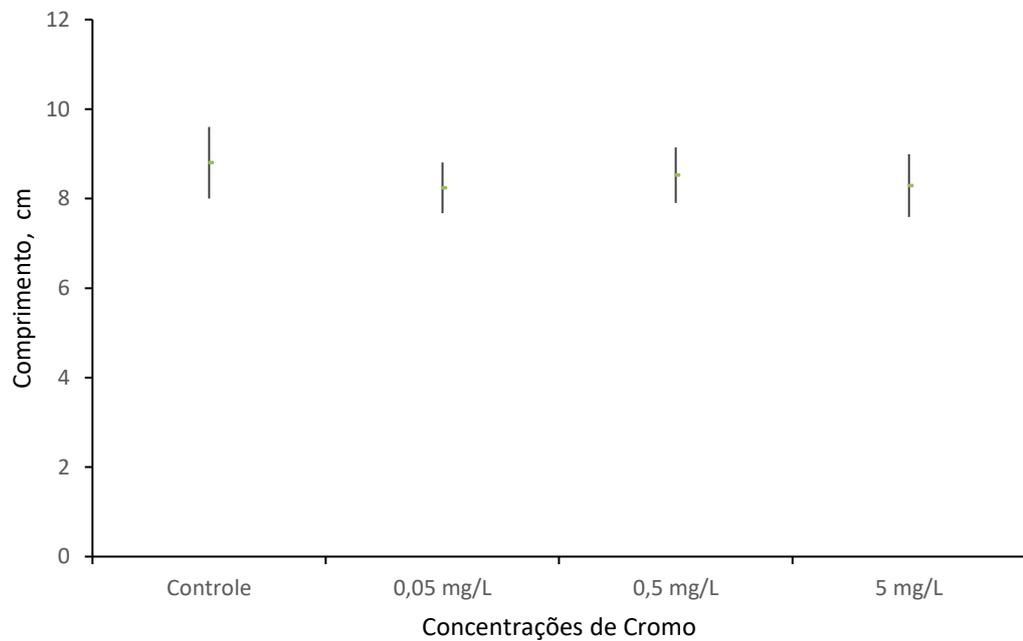


Figura 23 - Comprimento zoológico (Cz) de 14 peixes (medida do focinho até a fúrcula da nadadeira caudal) em exposição por um período de 15 dias.

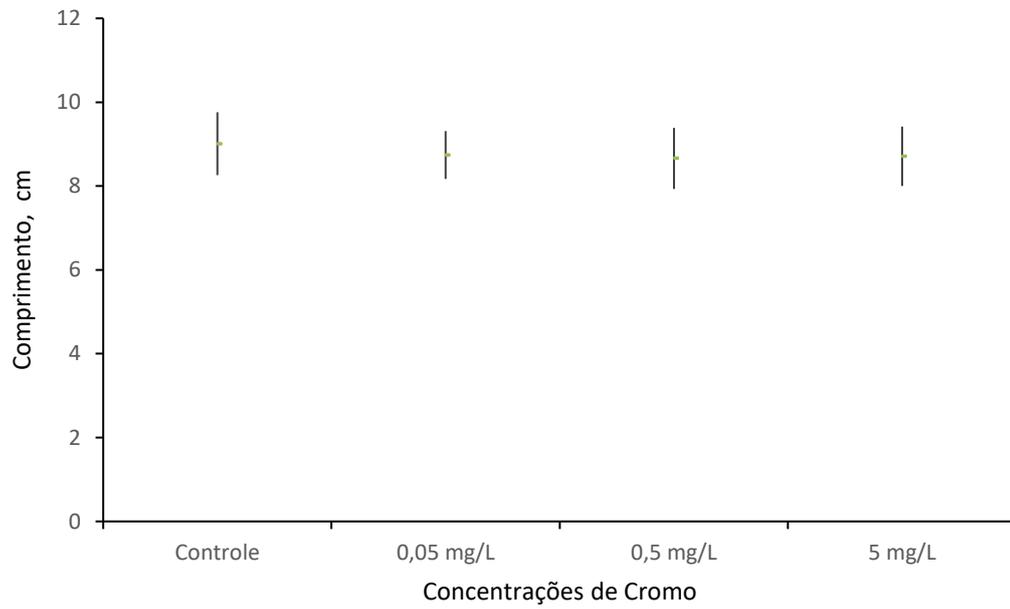


Figura 24 - Comprimento padrão (Cp) de 14 peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 5 dias.

**Comprimento padrão - sem barbatana caudal - período de 5 dias.**

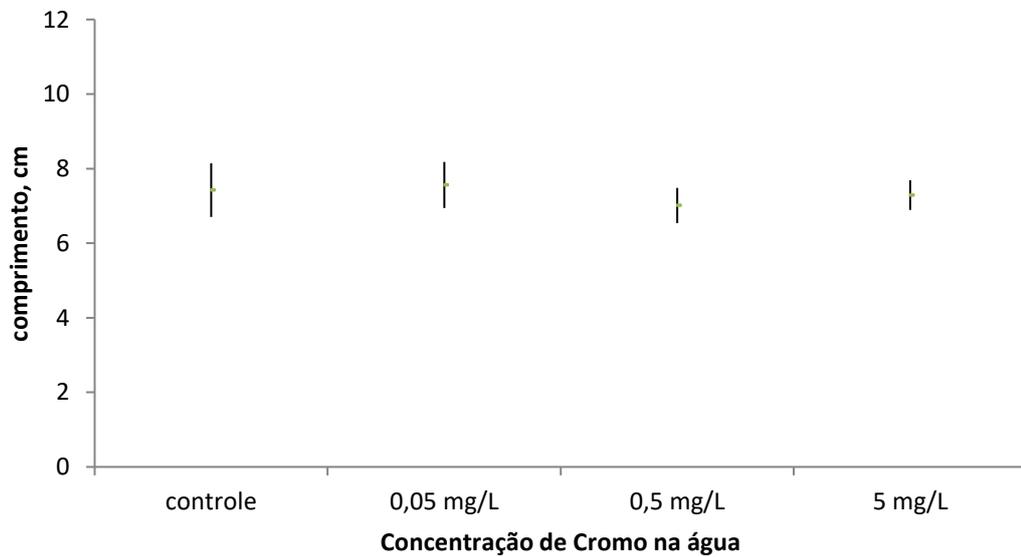


Figura 25 - Comprimento padrão (Cp) de 14 peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 10 dias.

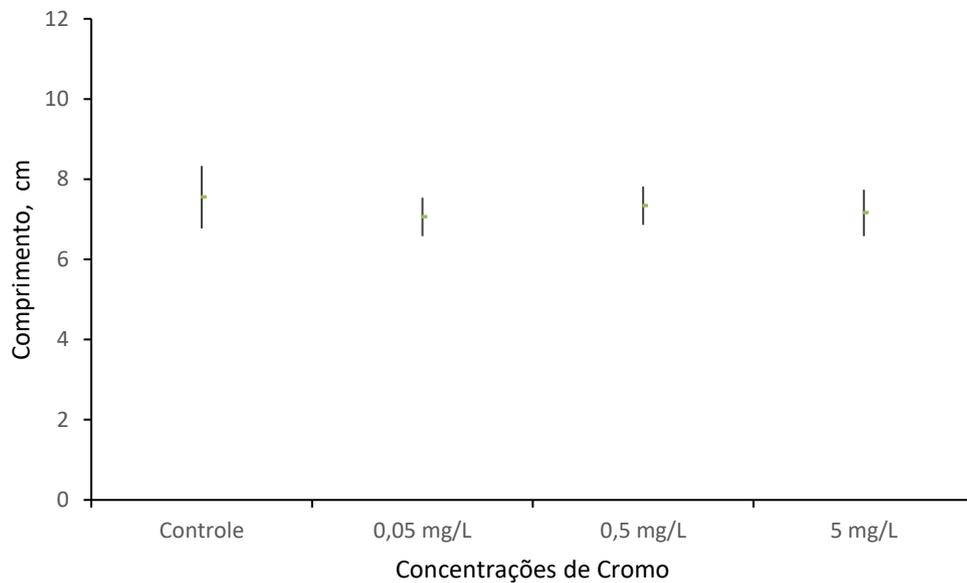
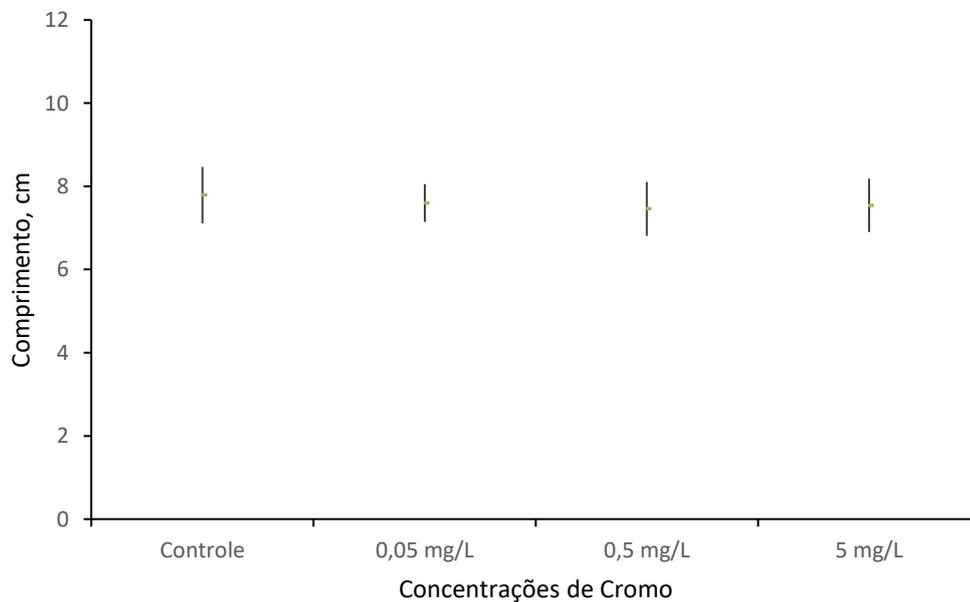


Figura 26 - Comprimento padrão (Cp) de 14 peixes (medida do focinho até a base da nadadeira caudal) em exposição por um período de 15 dias.



A análise dos dados biométricos dos espécimes juvenis de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) utilizados nos experimentos mostrou valores bastante homogêneos, quando considerados em média, não sendo, aparentemente, um fator importante de interferência na absorção do Cromo hexavalente pelos animais

expostos as diferentes concentrações utilizadas neste experimento. Os dados biométricos analisados foram dois tipos de comprimentos padronizados para medidas de peixes, o comprimento zoológico e o comprimento padrão, sendo o primeiro conseguido com a mensuração do animal, de seu focinho até a fúrcula da nadadeira caudal e o segundo pela mensuração do animal, de seu focinho até a base da nadadeira caudal (Campos e Oliveira, 2001). Em ambas as mensurações os animais apresentaram medidas próximas, mostrando uma homogeneidade nos tamanhos.

Durante todo o estudo os animais controles e testes se mostraram bastante resistentes, constituindo, dessa forma, uma boa opção para esse estudo. Durante o acondicionamento dos espécimes nos reservatórios, esses não apresentaram sinais de estresse ambiental importantes em nenhum momento, indicando uma boa tolerância às concentrações de Cromo hexavalente a que foram expostos, característica apropriada para realização desse estudo, bem como para a utilização desses animais em análises ambientais futuras.

Com a análise do estudo da absorção do Cromo por espécimes juvenis de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) em absorção atômica, observou-se resultados condizentes com a viabilidade do uso desses animais em testes ambientais para estudos associados à detecção e quantificação de Cromo hexavalente em contaminação de ambientes aquáticos.

#### **5.4. Dados referentes à análise histopatológica das brânquias, pele e fígado de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em três períodos distintos**

5.4.1. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, pele e fígado de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 5 dias.

Figura 27 – Comprimento das lamelas secundárias de brânquias de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

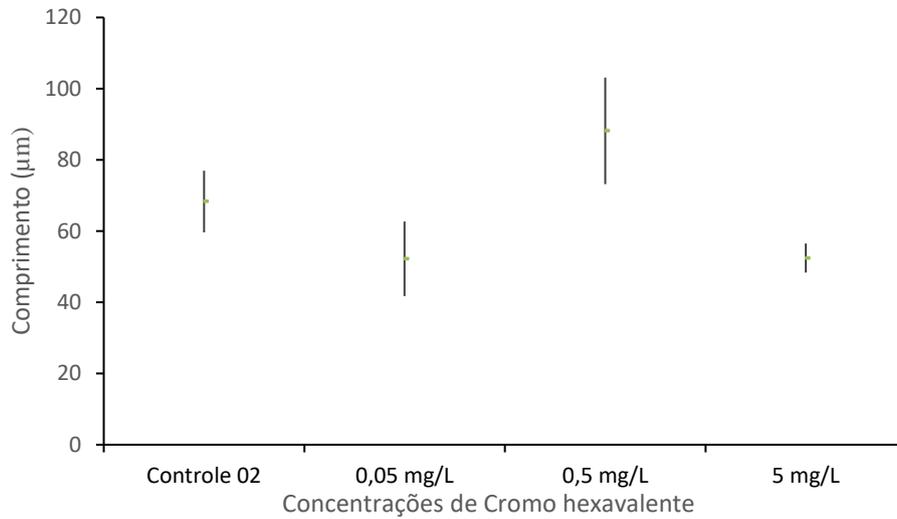


Figura 28 - Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

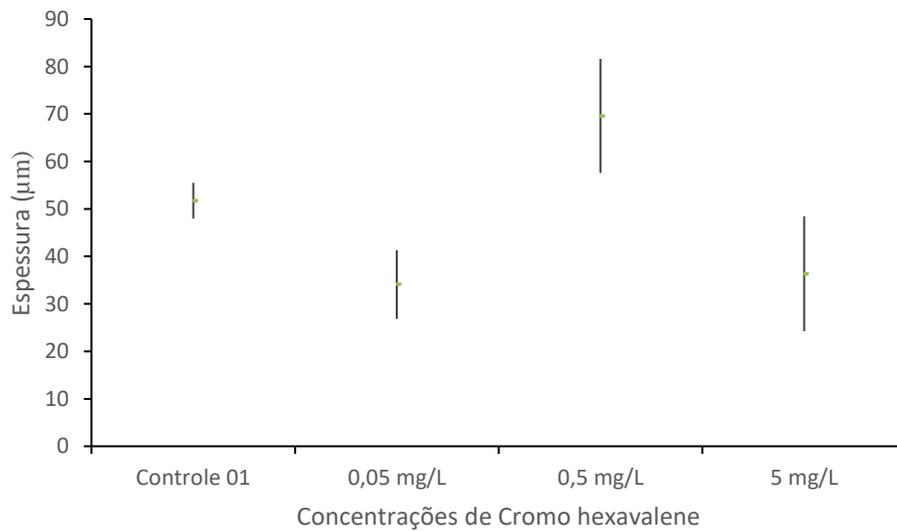


Figura 29 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.

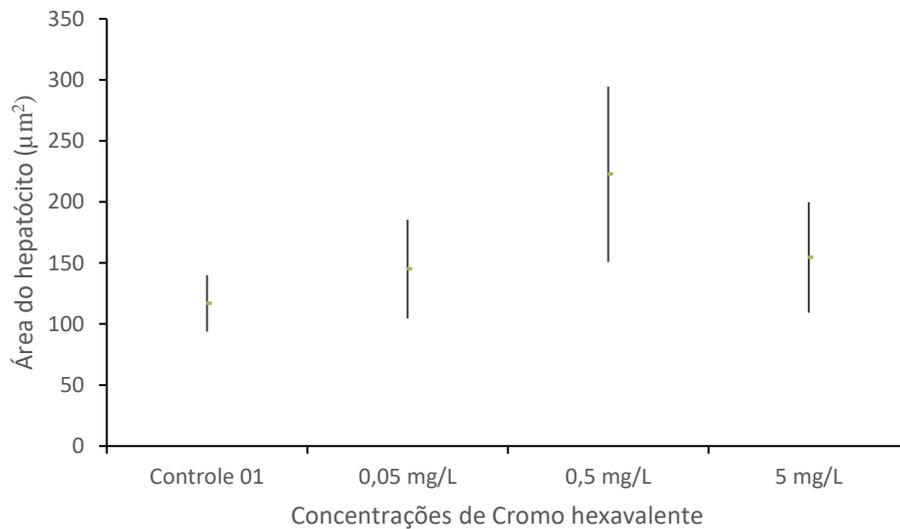
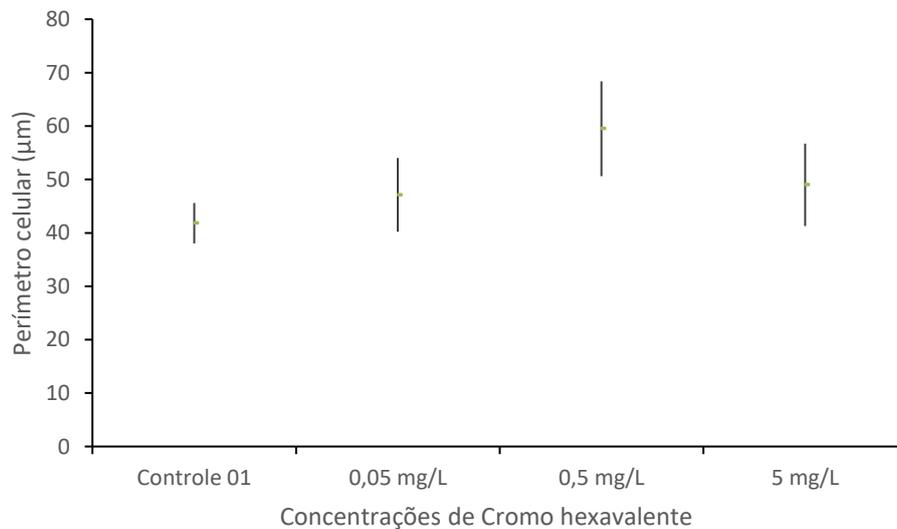


Figura 30 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 5 dias.



5.4.2. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, epiderme e fígado de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 10 dias.

Figura 31 - Comprimento das lamelas secundárias de branquiais de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

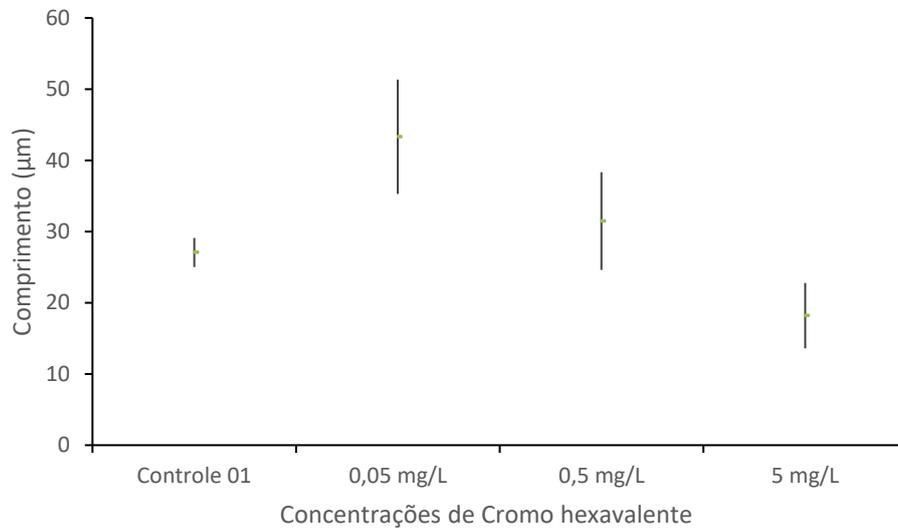


Figura 32 - Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

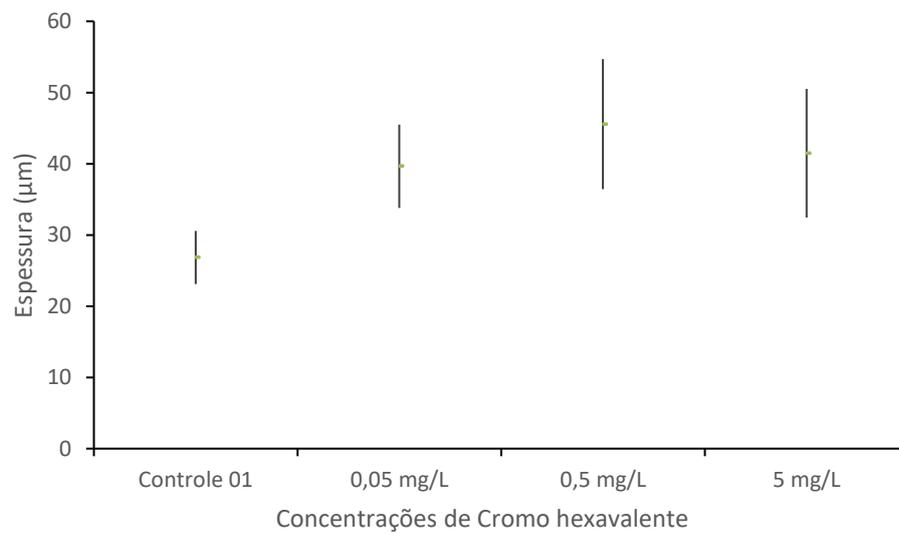


Figura 33 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.

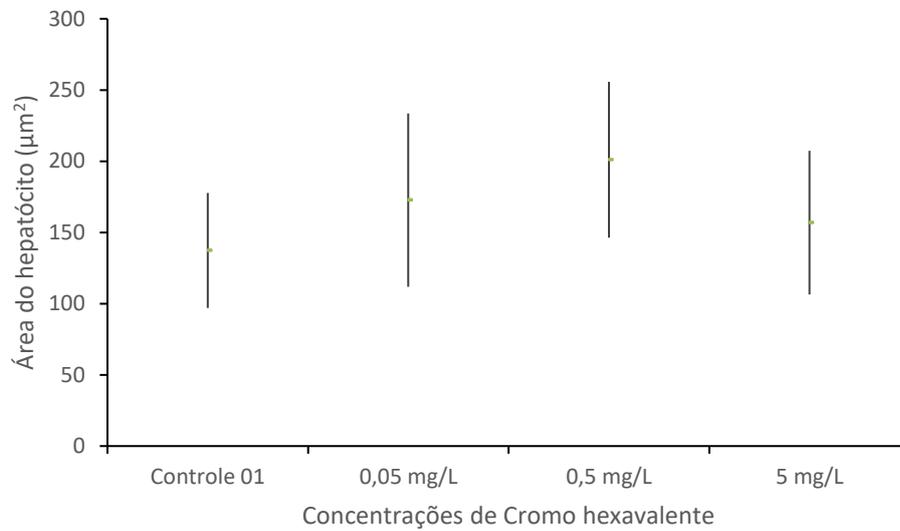
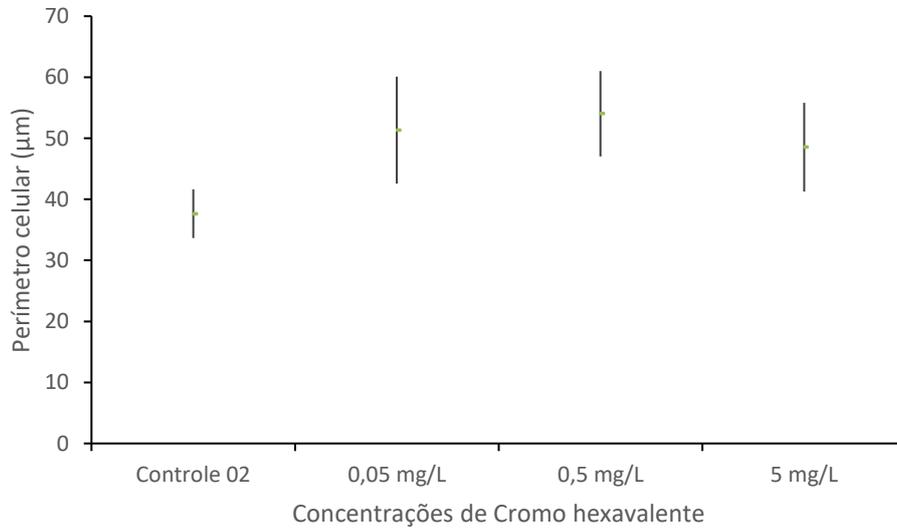


Figura 34 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 10 dias.



5.4.3. Dados referentes à análise histopatológica quantitativa das brânquias, pele e fígado de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em período de 15 dias.

Figura 35 - Comprimento das lamelas secundárias das brânquias de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

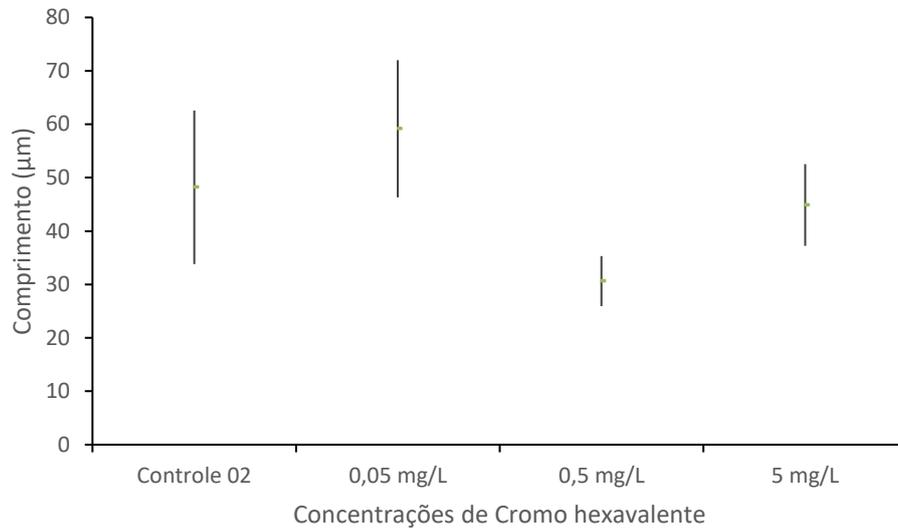


Figura 36 - Espessura da epiderme de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

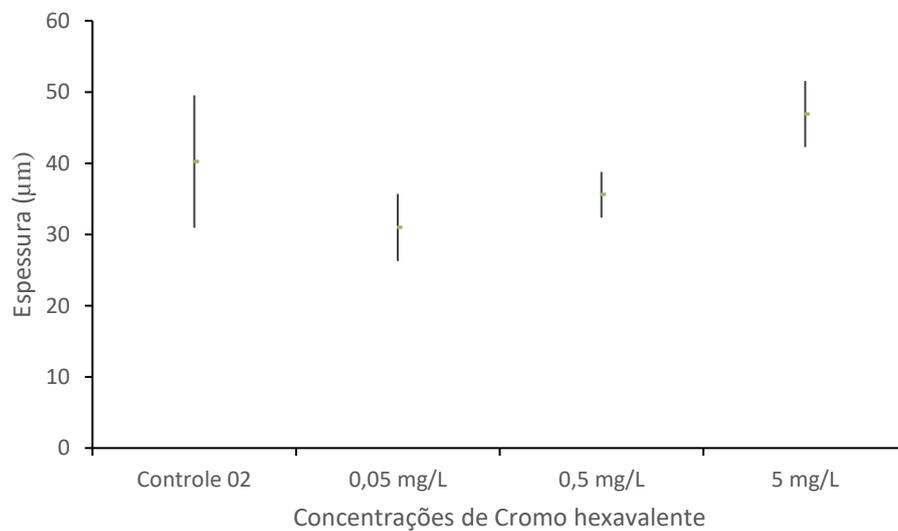


Figura 37 - Área dos hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias.

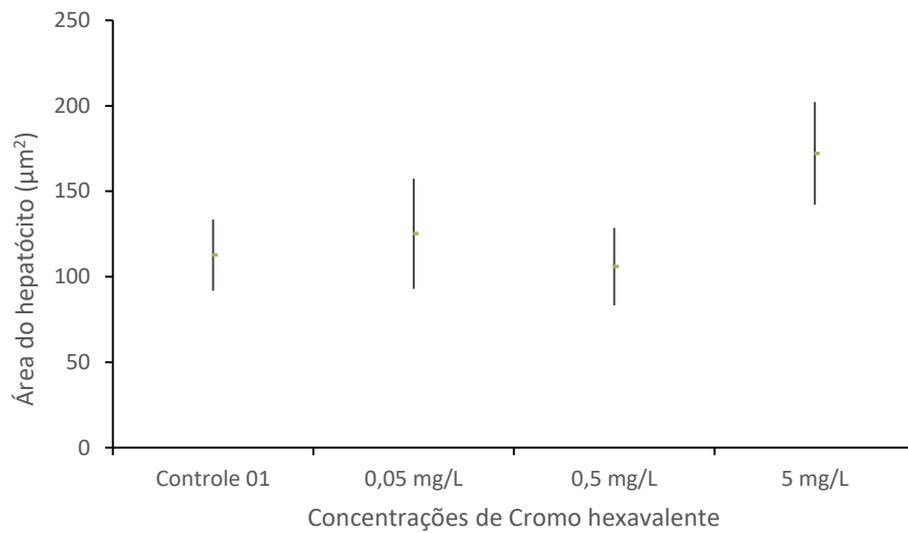
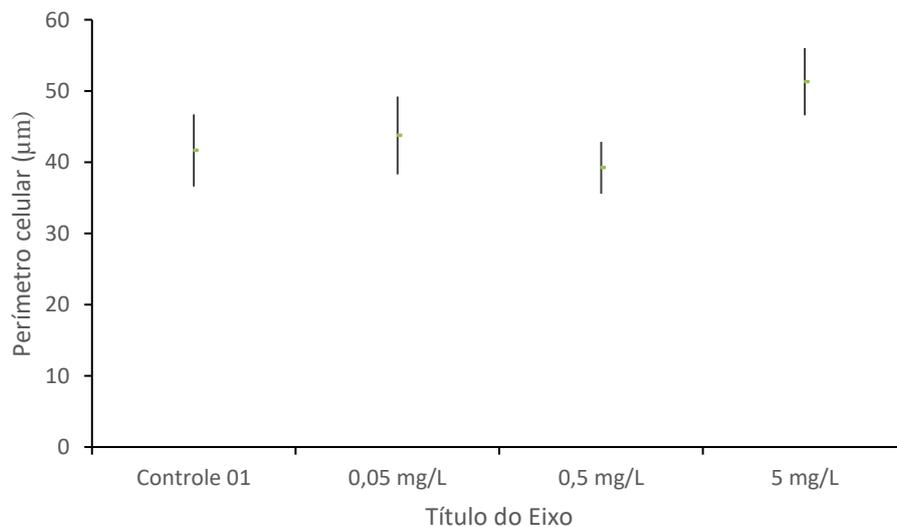


Figura 38 - Perímetro celular de hepatócitos de peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a diferentes concentrações de Cromo hexavalente em um período de 15 dias



A arquitetura histológica das brânquias, pele e fígado dos animais controles e tratados se mantiveram dentro das características normais. A Figura 39 mostra secções histológicas com 5 µm de espessura, coradas com HE de brânquias, pele e fígado dos animais pertencentes ao grupo de 15 dias

Alguns filamentos branquiais, entretanto, demonstraram uma hiperplasia epitelial interlamelar, e, em alguns casos, hiperplasia com preenchimento completo do espaço interlamelar, com conseqüente fusão do espaço lamelar (Figura 40). A

olho desarmado, as brânquias desses animais se mostraram avermelhadas, sugerindo uma hiperemia local.

Esses resultados corroboram dados da literatura que demonstram a capacidade do dicromato de potássio provocar hiperplasia em brânquias de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) (Castro et al., 2013).

Figura 39: Fotomicrografia de brânquias (A), pele (B) e fígado (C) de animal controle pertencente ao grupo de 15 dias. Aumento total: 200X, coloração: Hematoxilina e Eosina (H-E).

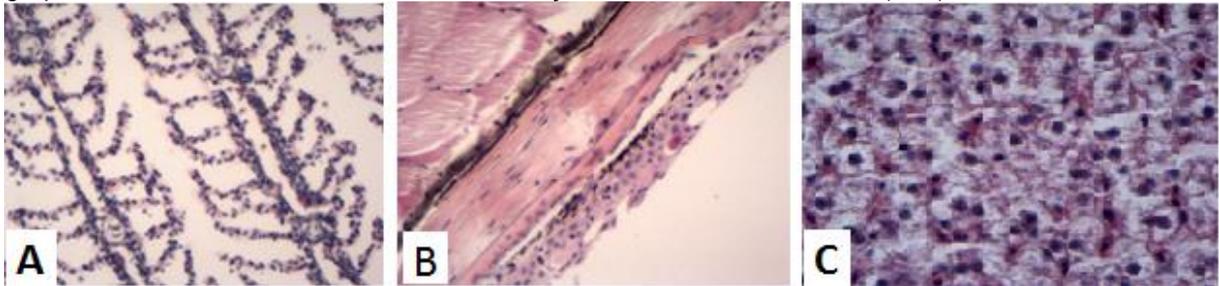
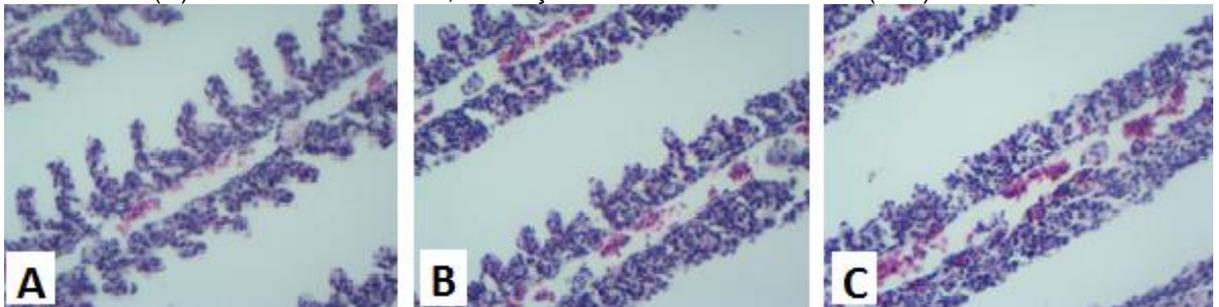


Figura 40: Fotomicrografia de brânquias animal pertencente ao grupo de 15 dias, demonstrando a hiperplasia do espaço interlamelar (A e B) e hiperplasia com completo preenchimento do espaço interlamelar (C). Aumento total: 200X, coloração: Hematoxilina e Eosina (H-E).



### **5.5. Determinação da CL<sub>50</sub> para exemplares juvenis de peixes tambaquis (*Colossoma macropomum*) em exposição à solução de Cromo hexavalente.**

A dose que se mostrou letal para 50% da população de 12 peixes Tambaquis (*Colossoma macropomum*) foi a de 27,5mg/L de dicromato de potássio, após 96 horas de tratamento. O valor encontrado para a determinação da CL<sub>50</sub> em exposição de exemplares juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) ao Cromo hexavalente nesse trabalho se mostrou semelhante a valores para a determinação de CL<sub>50</sub> encontrados em outro trabalho para a mesma exposição para outras espécies de peixes de água doce. O *Hemigrammus marginatus*, pertencente a mesma família do *Colossoma macropomum* utilizado em nosso experimento, apresentou determinação da CL<sub>50</sub> em 28,6 mg/L<sup>-1</sup> (Bertoletti, 2009) e o *Serrapinnus notomelas*, também pertencente à mesma família dos exemplares testados em nosso estudo para a mesma exposição ao Cromo hexavalente apresentou determinação da CL<sub>50</sub> em 26,9 mg/L<sup>-1</sup> (Bertoletti, 2009). Outra constatação foi de que o valor encontrado para a CL<sub>50</sub> em exposição de exemplares juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) ao Cromo hexavalente nesse trabalho se mostrou inferior a resultados obtidos com a exposição ao cromo hexavalente de uma espécie de peixes recomendada para testes toxicológicos pela NBR 15088 (ABNT, 2006), a *Danio rerio* (paulistinha), onde a CL<sub>50</sub> foi determinada em 31,8 mg/L<sup>-1</sup> (Bertoletti, 2009), mostrando outra característica favorável para bioindicadores, a sensibilidade ao agente poluente analisado.

## 6 CONCLUSÕES

Com a realização desse estudo as principais conclusões obtidas foram:

- Para as exposições dos exemplares juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) às concentrações de 0,05 mg/L, 0,5 mg/L e 5 mg/L de Cromo hexavalente por períodos de tempo de 5, 10 e 15 dias e posterior dosagem em absorção atômica, os resultados obtidos indicaram um padrão proporcional entre a quantidade de Cromo absorvida pelos animais e a concentração de Cromo na água, bem como em relação aos períodos de exposição, indicando a viabilidade da utilização dos animais como bioindicadores em análises de contaminação ambiental por Cromo hexavalente.
- Os valores obtidos com a análise estatística através do teste de se mostraram significativos para os resultados obtidos em relação à fixação e retenção do Cromo em massa seca dos exemplares utilizados, permitindo a constatação da confiabilidade desses dados para a interpretação e extrapolação em futuras análises e estudos.
- Pela análise histológica de materiais preparados a partir de tecidos componentes de brânquias, pele e fígado dos animais buscou-se sinais referentes a alterações promovidas pelo Cromo hexavalente nessas estruturas. Como resultado da análise qualitativa da arquitetura histológica foi observado, em animais expostos à concentração de 5 mg/L por 15 dias, sinais de hiperplasia preenchendo completamente o espaço interlamelar, indicando provável reação orgânica à contaminação.
- Os resultados quantitativos relacionados aos tecidos e células analisadas (Brânquias, epiderme e hepatócitos) apresentaram padrões numéricos inconsistentes com uma possível indicação de alterações dessas estruturas como resposta à contaminação pelo cromo hexavalente.
- Em condição experimental controlada, a concentração responsável pela morte de 50% dos exemplares juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos ao Cromo hexavalente em período de 96 horas de exposição, denominada como CL<sub>50</sub>, foi de 27,5 mg/L. Concentração atingida nessa etapa do experimento indica uma boa tolerância dos animais testados à contaminação por Cromo hexavalente, superando consideravelmente a

máxima concentração utilizada na análise de absorção pelos animais de Cromo hexavalente em níveis de concentração de 0,05 mg/L, 0,5 mg/L, 5 mg/L em períodos de 5, 10 e 15 dias realizada nesse experimento.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Após a realização desses estudos e análise de seus resultados, achamos que a utilização do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) é viável para a bioindicação de contaminação por Cromo hexavalente, tanto em ambientes controlados como em ambientes naturais que estejam contaminados ou em suspeita para a contaminação. Os resultados desse trabalho se mostraram elucidativos e confiáveis para concluirmos a viabilidade desse uso, principalmente em regiões que apresentem esse tipo de espécie como componente da ictiofauna ou climatologia semelhante à encontrada nesses ambientes, como é o caso da região norte do Brasil. Recomendamos a continuação das análises quantitativas contaminação por Cromo em massa seca em exemplares juvenis de Tambaquis (*Colossoma macropomum*) em concentrações superiores às trabalhadas nesse experimento para a observação da persistência do padrão de proporcionalidade encontrado esses experimentos. É também recomendável a realização de análise da arquitetura histológica das brânquias e de outros órgãos desses animais expostos a concentrações superiores do Cromo hexavalente para a confirmação dos aspectos qualitativos observados nas brânquias dos animais utilizados nesse estudo, bem como para a constatação de alterações não observadas ou de aspectos inconclusivos nesse trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Warith, A. A.; Younis, E. M.; Al-Asgah, N. A.; Wahbi, O. M. **Effect of zinc (Zn) toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus***. Scientific Research and Essays, v. 6, n. 17, p- 3760-3769, 2011

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2011 NBR 15088: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**. São Paulo. 19p.

Agostinho, A. A.; Thomaz, S. M.; Gomes, L. C. **Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil**. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 70 - 78, 2005

Aguiar, M. R. M. P. de; Novaes, A. C.; Guarino, A. W. S.; **Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos**. Química Nova, v. 25, p. 1145-1154, 2002

Antunes M. I. P. P.; Spurio, R. S.; Godoi D. A.; Grumadas, C. E. S.; Rocha M. A. **Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*)**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 1, p. 151-156, 2008

Arias A. R. L.; Buss D. F.; Albuquerque C.; Inácio A. F.; Freire M. M.; Egler M.; Mugnai R.; Baptista D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

Anderson, R. A. **Nutritional role of chromium**. Science of the Total Environment, v. 17, n. 1, p. 13-29, 1981.

Athikesavan, S.; Vincent, S.; Ambrose, T.; Velmurugan, B. **Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes)**. Journal of Environmental Biology, v. 27, n. 2, p. 391-395, 2006

Aceituno, J. **Mais 22 Crianças estão Contaminadas com Chumbo em Bauru.** O ESTADO DE SÃO PAULO. 12-04-2002.

AL-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.** Mutation Research, v.343, p. 121-135, 1995

Bertoletti, E. **Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais.** Revista Ciência e Cultura, v. 43, n. 3/4, p. 271-277. São Paulo, 1990

Bertoletti, E. **Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil.** Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology - Sociedade Brasileira Ecotoxicologia., v. 4, n. 1-3, 2009, 9-13. Campinas, 2009

Campos, Eduardo Costa; Oliveira, Jorge Eduardo Lins. **Caracterização biométrica e merística do saramunete, *Pseudupeneus maculatus* (Osteichthyes: Mullidae), em Ponta de Pedras, Pernambuco.** Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 27, n. 2, p.185 – 189, 2001.

Cardoso, M. F. **Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais.** Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2006

Castro M. P., Claudiano G. S., Bortoluzzi N. L., Garrido E., Fujimoto R. Y., Belo M. A. A., Shimada M. T., Moraes J. R. E., Moraes F. R. **Chromium carbocholate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*.** Aquaculture v. 432, p. 114 – 118, 2014.

Castro M. P.; Moraes F. R.; Fujimoto R. Y.; Cruz C.; Belo M. A. A.; Moraes, J. R. E. **Acute toxicity by water containing hexavalent or trivalent chromium in native Brazilian fish *Piaractus mesopotamicus*: anatomopathological alterations e mortality.** Bull Environ Contam Toxicol. v. 92, p. 213-219, 2013

Chapman, P. M. **Integrating Toxicology and Ecology: Putting the “eco” into ecotoxicology**. Marine Pollution Bulletin, v. 44, p 7-15, 2002

Chirwa, E.N.; Wang, Y.T. **Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria**. Water Research, Oxford, v.34, n.8, p.2376, 2000.

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio ambiente**. Resolução nº357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 2005

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio ambiente**. Resolução nº430, de 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 2011

Conceição D., Jacques R., Bento F., Simonetti A., Selbach P., Camargo F. **Redução de Cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com Cromo**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1661 – 1667, 2007.

Cotta J. A. O.; Rezende M. O. O.; Piovani M. R. **Teor de metais em sedimento do rio Betari no parque estadual turístico do Alto do Ribeira – Petar, São Paulo, Brasil**. Quim. Nova, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2006

CROMO – LABORATÓRIO VIRTUAL DE QUÍMICA – UNESP  
[http://www2.fc.unesp.br/lvq/LVQ\\_tabela/024\\_cromo.html](http://www2.fc.unesp.br/lvq/LVQ_tabela/024_cromo.html) Acesso em 20/11/2015

Curtius, A. J.; Fiedler, H. D.; Seibert, E. L.; Ferreira, J. F.; Vieira, P. H. F. **Avaliando a Contaminação por Elementos Traço em Atividades de Maricultura. Resultados Parciais de um Estudo de Caso Realizado na Ilha de Santa Catarina**, Quim. Nova, n. 26, v.1, p. 44-52, 2003.

Dallinger R.; Rainbow, P. S. **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton. 461, 2003

Depledge, M. H. **Conceptual Paradigms in Marine Ecotoxicology**. In: Proceedings of the 12th Baltic Marine Biologists Symposium. Olsen & Olsen, 1992

Dias, D. C.; Maiorino, F.C.; Ranzani-Paiva, M. J. T.; Ishikawa, N. M.; Lombardi, J. V., Ferreira, J. R., França, F. M., Ferreira, C. M. **Avaliação histopatológica do baço, coração e encéfalo de tilápia *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) exposta ao cloreto de mercúrio**. Boletim do Instituto de Pesca, v. 33, n. 2, p. 213-220, 2007.

Dornfeld, C. D. **Utilização de *Chironomus* sp (*Diptera Chironomidae*) para a qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2006

**Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil E. Bertoletti**

Freitas C. E. C.; Siqueira-Souza, F. K. **O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica**. Revista Agrogeoambiental, v. 1, n. 2, p. 39-45, 2009.

Gomes, M. V. T.; Sato, Y. **Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil**. Saúde e Amb. Rev., v.6, n.1, p. 24-30, 2011.

Handy, R. D.; Penrice W. S, **The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mikiss***. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 106C, n. 3, p. 111-124, 1993.

Haney, Jr. J. **Implications of dose-dependent target tissue absorption for linear and non-linear/threshold approaches in development of a cancer-based oral toxicity factor for hexavalent chromium.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* v.72, p. 194–201, 2015.

Heath, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology.** 2nd Ed. Lewis Publishers, 1995.

Jesus, T. B.; Carvalho, C. E. V. **Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg).** *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, p. 680-693, 2008.

Khan, H. A.; Sikdar-Bar, M.; Kamlesh B.; Adil, A. W.; Pervaiz A. **Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the african catfish *Clarias batrachus*.** *Journal of Applied Sciences Research* v.7, n. 7, p. 1087-1092, 2011.

Kennish, M. J. **Anthropogenic impacts on estuaries.** Em: KENNISH, M.J. (ed). *Ecology of Estuaries. Vol. 2. Biological Aspects* CRC Press, Boca Raton. p. 1- 8, 1991.

Lins, J. A. P. N.; Kirschnik, P. G.; Queiroz, V., S.; Cirio, S. M. **Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático.** *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba*, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010.

Lofrano G.; Liberato G.; Acanfora F. G.; Puccci L.; Carotenuto A. **Which lesson can be learnt from a historical contamination analysis of the most polluted river in Europe?** *Science of the Total Environment* v. 524–525, p. 246–259, 2015.

Lushchak, O.V.; Kubrak, O.I.; Lozinsky, O.V.; Storey, J.M.; Storey, K.B.; Lushchak, V.I. **Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney.** *Aquatic Toxicology*, v. 93, n. 1, p. 45-52, 2009.

Nakano V.; Avila-Campos M. J. **Metais pesados: um perigo eminente.** [www.icb.usp.br/~mariojac/links.html](http://www.icb.usp.br/~mariojac/links.html). , 2002. Acesso em 20/11/2015.

Machado, I., Maio, F. D.; Kira, C. S.; Carvalho, M. F. H. **Estudo da Ocorrência dos Metais Pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na Ostra de Mangue *Crassostrea brasiliiana* do Estuário de Cananéia SP, Brasil**, Rev. Inst. Adolfo Lutz; v. 61, n. 1, p. 13-18, 2002.

Meletti, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2003.

Miranda Filho, A. L.; Mota, A. K. M.; Cruz, C. C.; Matias, C. A. R; Ferreira, A. P. **Cromo Hexavalente em Peixes Oriundos da Baía de Sepetiba no Rio de Janeiro, Brasil: Uma Avaliação de Risco à Saúde Humana.** Ambi-Agua, Taubaté, v. 6, n. 3, p. 200-209, 2011. (<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.568>) Acesso em 20/11/2015.

Pain, D. J. **Lead in the Environment.** In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). Handbook of ecotoxicology. Boca Raton: Lewis, p. 356-391, 1995.

Repula, C. M. M.; Campos, B. K.; Ganzarolli E. M.; Lopes M. C.; Quinália S. P.; **Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce.** Quim. Nova, v. 35, n. 5, p. 905-909, 2012.

Sabesp, 2015

<http://www2.sabesp.com.br/mananciais/DivulgacaoSiteSabesp.aspx>), Acesso em: 20/11/2015.

Salomons, W.; Förstner, U.; Mader, P. **Heavy Metals.** Springer; 412p, 1995.

Tundisi J. G. **O Futuro dos Recursos: Recursos Hídricos.** Revista Multiciência: UNICAMP, Campinas, 2003. [https://www.multiciencia.unicamp.br/intro\\_01.htm](https://www.multiciencia.unicamp.br/intro_01.htm), Acesso em 10/11/2015

Vitek, T.; Spurny, P.; Mares, J.; Zikova, A. **Heavy Metal Contamination of the Loucka River Water Ecosystem**, Acta Vet. Brno, v. 76, p. 149-154, 2007.

Washington, H.G. **Diversity, Biotic and Similarity Indices. A Review With Special Relevance to Aquatic Ecosystems**. Water Research, v.18, p.653-694, 1984.