



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS

TOXICIDADE DO CÁDMIO EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

DRIELE VENTURA DE PAULO

ILHÉUS - BAHIA

2013

DRIELE VENTURA DE PAULO

TOXICIDADE DO CÁDMIO EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Fábio Flores Lopes

Co-orientador: Dr. Luís Gustavo Tavares Braga

ILHÉUS - BAHIA

2013

P331

Paulo, Driele Ventura de.

Toxicidade do cádmio em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) / Driele Ventura de Paulo. – Ilhéus, BA: UESC, 2013.

61f. : il.

Orientador: Fábio Flores Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais.

Inclui referências.

1. Tilápia (Peixe) - Crescimento. 2. Toxicologia experimental. 3. Cádmio. 4. Metais - Toxicologia. I. Título.

CDD 636.31

DRIELE VENTURA DE PAULO

TOXICIDADE DO CÁDMIO EM *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Fábio Flores Lopes – Dr.

UESC/DCB (Orientador)

Daniela Mariano – Dr^a.

UESC /DCB

Vânia Loro – Dr^a.

UFSM / DQ

ILHÉUS – BA

2013

DEDICATÓRIA

À Deus meu motivador de sonhos e meu ajudador.

“Bendize, ó minha alma, ao SENHOR, e não te esqueças de nenhum de seus benefícios.”

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Meus sinceros agradecimentos à minha família, em especial ao Sr. Domingos Francisco de Paulo, minha irmã Dhâmara Ventura e a minha mãe de coração Ana Cristina Brandão pelo incentivo, apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Flores Lopes, exemplo humildade, sabedoria e simplicidade. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade, incentivo, paciência, amizade e paternidade profissional adquirida ao longo dos sete anos de orientação.

Ao meu co-orientador Dr. Luís Gustavo Tavares Braga, agradeço pela orientação, e pelos ensinamentos, apoio, suporte técnico e amizade.

À Universidade Estadual de Santa Cruz pela disponibilidade de infra-estrutura e aprovação ética do projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa durante o trabalho.

Aos membros do Laboratório de Histologia – Arielle Cruz, Laís Lopes, Rafaela Rocha, Carol Pereira, Milane Correia e Maxwell Ribeiro – por terem tornado este trabalho mais prazeroso, pela ajuda durante as mais diversas etapas do projeto e principalmente pela grande amizade.

Aos membros da equipe AQUANUT- Francisco Júnior, Kauana Lima, Filipe Cipriano, Ricardo Bastos, Willian Toninni - pelo bom humor e toda colaboração nas coletas e na realização deste trabalho.

Ao Dr. Raildo e equipe do Laboratório de Química Analítica da Universidade Estadual de Santa Cruz – Madson Nascimento, Lucas Mota, Anderson Aleixo e Pedro Moreau pela disponibilidade e ajuda nas análises.

A todos os funcionários da GERLAB em especial a Thiago, Gerson Teixeira e Augusta Miranda pela valiosa contribuição.

Aos professores da banca de avaliação, Prof^ª. Dr.^ª Daniela Mariano e Vânia Loro, que me ajudaram com seus conhecimentos, contribuições e imensa sabedoria, e ao Prof. Dr. Paulo Carvalho pela enfática ministração ecotoxicológica que tanto me fascinou.

Aos meus amigos Jorsanete, Haialla Rialle, Thais Cerqueira, Anderson Brito, Maxwell Messias, Jaqueline Oliveira, Ana Cláudia Novais, Vanuza e família Solidade e demais familiares que direta ou indiretamente muito colaboraram para a realização deste trabalho.

Agradeço às tilápias que serviram de material biológico para essa pesquisa, morrendo em favor do conhecimento científico e crescimento profissional.

A vocês minha gratidão!

RESUMO

O cádmio é um metal pesado e possui alta toxicidade em baixas concentrações e apresenta efeitos agudos e crônicos na saúde de animais aquáticos. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito toxicológico de diferentes concentrações de cádmio sobre juvenis de *Oreochromis niloticus* avaliando a influência deste metal sobre o desempenho produtivo (crescimento, ganho de peso, sobrevivência e índice hepatossomático-IHS) e o desenvolvimento de alterações histopatológicas no fígado dos peixes. Foram utilizados 200 juvenis de *O. niloticus* ($0,88\text{g} \pm 0,2$) durante 21 dias, distribuídos em 20 aquários de vidro, com volume de 30 L em uma densidade de 10 peixes/aquário, em cinco tratamentos (controle, 1mgL^{-1} , 5mgL^{-1} , 10mgL^{-1} e 15mgL^{-1}). Foi observado que os indivíduos expostos a concentrações de 5 a 15mgL^{-1} apresentaram hiperatividade respiratória, perda do equilíbrio natatório e morte, sendo consideradas como tóxicas e letais para os indivíduos no período de 96 horas de exposição. Em contrapartida, foi verificado que a concentração de 1mgL^{-1} foi considerada subletal uma vez que permitiu a sobrevivência, proporcionou uma condição de sobrevivência e o desenvolvimento de alterações, tanto no desempenho produtivo quanto nas análises histopatológicas. A avaliação de toxicidade crônica nos indivíduos expostos a concentrações de 1 e 5mgL^{-1} demonstrou que houve redução significativa no crescimento e ganho de peso dos indivíduos expostos a 5mgL^{-1} , evidenciando que em caso de contaminação com esta concentração o desempenho produtivo pode ser afetado, promovendo uma redução no ganho de peso dos indivíduos. A análise histopatológica demonstrou que o cádmio provocou a ocorrência de alterações histopatológicas severas nos peixes. Desta forma, a bioacumulação de cádmio em concentrações acima do limite aceitável para os seres vivos pode resultar no desenvolvimento de alterações como respostas de alarme e exaustão em função do estresse gerado, levando a mudanças nas condições fisiológicas normais.

PALAVRAS-CHAVES: Toxicidade; Cádmio; *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal and has high toxicity at low concentrations and has acute and chronic effects on the health of aquatic animals and ecosystems. The aim of this work was to study the toxicological effect of different concentrations of cadmium chloride on samples of *Oreochromis niloticus* evaluating the influence of this metal on zootechnical performance (growth, weight gain, survival and hepatomatic Index- IHS) and the development of histopathological changes in the liver. Ten specimens of *O. niloticus* were distributed into five treatments (control, 1mgL⁻¹, 5mgL⁻¹, 10mgL⁻¹, and 15mgL⁻¹) which were observed that concentrations of 10 and 15mgL⁻¹ were considered to be highly toxic and lethal because promoted the killing of subjects during 96 hours of exposure. However the concentrations of 1 and 5mgL⁻¹ were considered as sublethal therefore allowed the subject survival and provided a challenge to the survival and development of modifications, both in performance and in histopathological analysis. It was observed by histopathological analysis that the individuals who already had a poor health condition, probably due to the action of masculinizing hormone placed in feed for fattening animals, and that cadmium increased the severity of pre-existing histopathological changes and inhibited performance of masculinizing hormone in stimulating the body size and weight gain of fish. Consequently, the bioaccumulation of metal above the acceptable concentrations for any individual, invariably results in the development of alarm responses due to the generated stress leading to the development of changes and a change in the normal physiologic conditions. In adverse exposure to metals such as cadmium, along with other contaminants present both in natural environment or fish farming, may result in development of potentiated or inhibited alterations due to a synergistic action of these substances.

KEYWORDS: Toxicity, Cadmium, *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE FIGURAS

1. Exemplar juvenil de <i>Oreochromis niloticus</i>	19
2. Mortalidade dos indivíduos em cada tratamento durante o período de 72 horas.....	26
3. Média das concentrações de cádmio nos tratamentos.....	27
4. Bioacumulação do cádmio em fígado de <i>O. niloticus</i> durante 21 dias.....	28
5. Índice hepatossomático (IHS) de <i>O. niloticus</i>	32
6. Alterações histopatológicas em fígado de <i>O. niloticus</i>	35
7. Frequência de intensidade de alterações histopatológicas observadas no fígado.....	39
8. Índice de alteração histopatológica (IHA) do fígado de <i>O. niloticus</i>	40

LISTA DE TABELAS

1. Classificação das alterações histopatológicas observadas no fígado de *O. niloticus*....24
2. Variáveis físicas e químicas da água dos aquários durante o experimento.....25
3. Fator de bioacumulação (FBA) do cádmio no fígado29
4. Correlação de matriz da concentração de cádmio na água em função das variáveis biológicas avaliadas.....29
5. Desempenho de juvenis de *O. niloticus* expostos a diferentes concentração de cádmio.....31
6. Frequência das alterações histopatológicas no fígado.....36

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Desenho amostral.....	19
3.3 Tratamentos e concentração do metal.....	19
3.4 Desempenho.....	20
3.5 Bioconcentração e bioacumulação.....	21
3.6 Histopatologia do fígado.....	22
3.7 Análise estatística dos dados.....	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Variáveis físicas e químicas.....	25
4.2 Mortalidade.....	25
4.3 Bioconcentração na água e bioacumulação de cádmio no fígado.....	27
4.4 Desempenho produtivo.....	30
4.5 Histopatologia do fígado.....	32
5. DISCUSSÃO	40
5.5 Toxicidade aguda.....	41
5.6 Toxicidade crônica.....	42
5.7 Análise histopatológica.....	46
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A atuação dos poluentes sobre os organismos tem sido alvo de muitos estudos ambientais, entre eles os ecotoxicológicos, devido aos efeitos danosos que estes poluentes têm promovido ao ambiente aquático e aos organismos que neles se encontram. A expansão urbana, a ocupação desordenada do solo e a falta de planejamento ambiental ou urbano têm provocado aumento na liberação indiscriminada de agentes poluidores nesses ambientes aquáticos. Metais pesados presentes em efluentes, industriais ou agrícolas, em agrotóxicos, ou originários de exploração rochosa ou de fertilizantes, hormônios sintéticos e substâncias tóxicas eutrofizantes são exemplos de compostos lançados neste ambiente (Andreoli e Carneiro, 2005; Bollmann, 2003).

Os estudos ecotoxicológicos iniciaram a partir de 1969, após a II Guerra Mundial, com metodologia rudimentar e focada principalmente nos efeitos do DDT. No Brasil, o uso deste pesticida em lavouras começou a ser avaliado toxicologicamente entre 1976 a 1979 em função da contaminação humana pelo uso de alimentos contaminados por agrotóxicos (Moura, 2007; Fukushima e Azevedo, 2008). Estes estudos ajudaram na interrupção do uso destes contaminantes através da regulamentação em 1975, de um programa de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade de Águas - TC 147 da International Organization for Standardization (ISO) (Zagatto e Bertolotti, 2006). Posteriormente foram implementadas as Resoluções 344/2004, 421/2010 e 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, que salientavam que a avaliação meramente química das substâncias tóxicas no ambiente não era suficiente para analisar o grau do impacto nos animais, havendo assim a necessidade de se detectar e avaliar o efeito destes poluentes nos organismos expostos por outros métodos.

Os metais, os agrotóxicos, e os hidrocarbonetos derivados de petróleo são alguns dos compostos químicos estudados pela ecotoxicologia, devido ao potencial tóxico destas

substâncias sobre os organismos e o ecossistema, mesmo que em pequenas concentrações (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Autores como Singh, Sharma, Agrawal et al. (2010) categorizaram os metais pesados e os pesticidas como poluentes ambientais capazes de gerar impactos negativos sobre a saúde dos animais, bem como dos seres humanos. A presença destes contaminantes na água tem sido relatada por Bruschi Jr. e Malabarba (2000) e Olurin, Olojo, Mbaka et al. (2006) como sendo precursores de oscilações, ou ainda como intensificadores do processo de deterioração do ambiente aquático, uma vez que estes poluentes promovem alterações graves sobre a população, comunidade ou ecossistema, a depender do grau de contaminação e do tempo de exposição dos indivíduos (Jesus e Carvalho, 2008).

Os metais conhecidos como metais pesados apresentam densidade igual ou acima de 5 g/cm³. Alguns deles são classificados como metais traço, pois ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações (Egreja Filho, 1993). Podem ser considerados como essenciais, quando se encontram em concentrações ideais, ao funcionamento metabólico normal dos organismos, como por exemplo, o zinco, ferro e cromo que atuam na formação e estabilidade de proteínas e no transporte de gases na respiração celular (Abdulla e Chimieclnicka, 1990). A presença destes metais no corpo, mesmo em baixas concentrações, pode proporcionar o desenvolvimento de sérias doenças, tais como anemia por deficiência de ferro e retardamento do crescimento corpóreo pela falta de zinco (Bury, Walker e Glover, 2003). Outros podem desencadear algum efeito tóxico, quando se encontram em concentrações que comprometem o desempenho metabólico ou não possuem função biológica conhecida Prosi (1979).

A toxicidade de cada metal varia de acordo com a espécie e Ximenes (2006) salientou que existe uma toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: mercúrio, prata, cobre, zinco, níquel, chumbo, cádmio, arsênio, cromo, estanho, ferro, manganês, alumínio, berílio e lítio. Estes são considerados poluentes

altamente tóxicos quando encontrados em concentrações elevadas, nos diferentes níveis ambientais, sendo poluentes conservativos (não degradáveis ou que demandam longos períodos no ambiente) e que estão em constante renovação no ambiente (Campos, Silva, Furtini Neto et al., 2005).

Quando presentes no ecossistema aquático, estes metais podem ser bioacumulados passivamente nos organismos através da água ou alimento e como consequência da fixação dos metais nos tecidos, a acumulação nos órgãos pode vir a promover desidratação nos indivíduos, com redução na capacidade de consumo do alimento e aumento da excreção. Em concentrações elevadas podem apresentar efeitos tóxicos subletais, sendo inclusive biomagnificados ao longo de cadeias alimentares (Valavanidis e Vlachogianni, 2000; Zagatto e Bertolletti, 2006).

Dentre os metais de importância toxicológica, pode ser destacado o cádmio, cuja contaminação aquática pode ocorrer por escoamento de águas residuais de atividades mineradoras, ações intempéricas como erosão do solo ou rocha mãe, descargas atmosféricas devido a ações industriais próximas, ou pelo uso de fertilizantes fosfatados na agricultura (WHO, 1992; Singh, Sharma, Agrawal et al., 2010). Estes organofosforados são amplamente utilizados para correção ou nutrição de solos na agricultura e contêm vários elementos metálicos ou micronutrientes da rocha que os originou e ou dos ingredientes usados na industrialização do fertilizante.

O cádmio pode apresentar vários usos antrópicos, como em baterias, tratamento da borracha, produção de pigmentos e em indústrias de galvanoplastia, proporcionando o brilho, a resistência à corrosão aos objetos e em fungicidas e fertilizantes organofosforados (Singh, Sharma, Agrawal et al., 2010). É um metal que possui baixa mobilidade e pouca capacidade de penetração no solo, ficando associado a camadas superficiais (WHO, 1992), podendo, portanto, ser absorvido pelas plantas e ingressar na cadeia alimentar ou ainda ser escoado para

regiões mais distantes através de ações intempéricas (USEPA, 1992). Quando escoado por uma fonte difusa até os rios, esse metal pode ser transportado pelo curso d'água a distâncias de até 50 km, pois apresenta grande mobilidade na água, já que pode ser encontrado na forma hidratada ou complexada com outras substâncias orgânicas e inorgânicas (CRA, 2001). Não possui função biológica conhecida para os organismos e pode se acumular em microrganismos e nos tecidos de vegetais e animais.

A assimilação deste metal em peixes ocorre principalmente por via oral através da água, água e alimentos e pela derme e o seu acúmulo ocorre principalmente nas brânquias, fígado e rins e aumenta em função de sua concentração na água e do tipo de espécie que se encontra exposta (Kumar e Singh 2010; Singh, Sharma, Agrawal et al., 2010). Estudos reportam alterações em diversos tecidos, órgãos e sistema hormonal, devido ao potencial bioacumulador deste metal, porém sem evidências de sua biomagnificação ao longo da cadeia trófica (Mason, 1991); (CRA, 2001; Zagatto e Bertoletti, 2006).

Um dos possíveis métodos empregados em estudo toxicológico é o de bioensaio com peixes (Valavanidis e Vlachogianni, 2000), que tem sido utilizado para avaliar o efeito das substâncias tóxicas nos organismos que vivem nesses ecossistemas, por meio da avaliação dos efeitos nocivos de um contaminante lançado no ambiente. Este tipo de teste tem sido considerado eficaz, uma vez que é capaz de prever os níveis de substâncias químicas que produzem efeitos adversos observáveis nos organismos testes, mas que ainda não são detectados na população humana (Cairns e Pratt, 1989). Este teste pode ainda definir quais concentrações são consideradas potencialmente de risco e passíveis a desenvolver efeitos biológicos e comportamentais nos indivíduos.

Outro mecanismo de avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica, em áreas impactadas, são os biomarcadores que vêm sendo amplamente utilizados nas últimas décadas como instrumento preventivo de poluição (Decaprio, 1997). Os

biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, morfométricas, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (Depledge, Aagaard e Györkos, 1994). Os mesmos autores salientaram ainda que o uso destes biomarcadores pode ajudar a elucidar os mecanismos de atuação de diversos tipos de agentes estressores e proporcionam a oportunidade para determinar que as condições fisiológicas dos organismos estejam fora da faixa de homeostase.

Neste sentido, as análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo e diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos e no estudo de bioacumulação de metais pesados em teleósteos (Oliveira-Ribeiro, Schatzmann, Silva de Assis et al., 2002; Oliveira-Ribeiro, Vollaire, Sanchez-Chardi et al., 2005) e lesões específicas que ocorrem nos órgãos de peixes expostos às substâncias tóxicas sob condições de laboratório ajudam a identificar biomarcadores de exposição (Jesus e Carvalho, 2008). Em avaliações ambientais, as análises histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições do ambiente e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (Schmalz, Hernez e Weis, 2002).

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois apresentam ampla distribuição geográfica, compõem vários microambientes aquáticos e participam ainda, de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (Rodrigues, 2003). Estes organismos são capazes de desenvolver ajustes comportamentais, fisiológicos e bioquímicos que lhes permitam viver em condições ambientais desfavoráveis com a presença de metais traço e poluentes dos mais diferentes tipos (Val, Silva e Almeida-Val, 2004).

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) é uma espécie exótica, constante no rio Cachoeira (Flores-Lopes, comunicação pessoal) e tem sido bastante estudada devido ao processo de deterioração deste ambiente. A bacia está em processo de degradação, o que representa um possível risco a saúde da população ribeirinha que consome este recurso. Ao

realizar estudos neste ambiente, Paulo, Fontes e Flores-Lopes (2012) verificaram a ocorrência de alterações histopatológicas severas no fígado de *Poecilia vivipara*, em pontos próximos aos estudados por Klumpp, Bauer, Franz-Gerstein et al. (2002) e associaram a ocorrência destas respostas a exposição contínua a agentes estressores, tais como metais traço em função de agrotóxicos e curtume a montante do rio, o que provavelmente estariam alterando a qualidade do ambiente aquático. Um dos metais tóxicos presentes no rio Cachoeira foi o cádmio, sendo verificado em amostras de sedimento e água, em alguns pontos do rio Cachoeira (Souza Lima et al., 2009; CRA 2001a), e pode está associado a ocorrência desta alteração ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar o potencial tóxico do cádmio em exemplares de *Oreochromis niloticus*.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar ocorrência de alterações histopatológicas de fígado em juvenis de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de cádmio;
- Verificar o grau de influência do Cádmio na severidade das alterações histopatológicas encontradas;
- Observar o desempenho produtivo, como ganho de peso e sobrevivência dos peixes nas diferentes concentrações do metal durante o período de exposição;
- Estabelecer relação entre as alterações histopatológicas observadas no fígado com o desempenho e o índice hepatossomático dos exemplares;

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de bioensaio foi realizado por um período de 21 dias, de 31 de agosto a 19 de setembro de 2012, em que foram utilizados exemplares de *O. niloticus* masculinizados, com média de peso de $0,88 \pm 0,2$ g e comprimento total de $37,5 \pm 3,3$ mm (Figura 1) provenientes da fazenda de cultivo de peixes Aguavale, situada no município de Ituberá-BA. Na fazenda, durante a fase de pós larva, os indivíduos passaram por um período de reversão sexual, através de dosagens de hormônio andrógeno misturados à ração a fim de que ocorresse uma masculinização dos indivíduos.

Antes do experimento, os exemplares foram transferidos para dois tanques com volume de 310 L no laboratório de nutrição e alimentação de peixes (AQUANUT) onde passaram por um período de adaptação por 5 dias, a fim de verificar possíveis variações de estresse e mortalidade que pudessem interferir no experimento. Após esse período, foi observada a relação entre o número de amostragem necessária e o processo de assimilação pelos indivíduos para que não fosse afetada a capacidade de suporte do compartimento, que abrigou 200 exemplares juvenis de *O. niloticos* em 20 aquários de vidro (25X40X40), com volume de 30 L em uma densidade de 10 peixes/aquário. O experimento seguiu o modelo de sistema estático sem reposição do metal, onde os aquários possuíam aeração artificial individual e diariamente eram realizadas a sifonagem dos mesmos para retirada de fezes e sobras de ração e eram mensuradas as variáveis físicas e químicas da água com os aparelhos multiparâmetros (Sonda YSI Professional Plus, Oxímetro portátil HI9146-04 com precisão de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e multiparâmetro portátil HI991300, para avaliação do pH com precisão de 1ppm).

A alimentação era realizada três vezes ao dia com ração comercial extrusada com 40% de proteína bruta. Em cada arraçoamento, a quantidade de ração foi ajustada até a saciedade aparente dos indivíduos, de forma a obter o mínimo de sobras. A alimentação foi

suspensa 24 horas antes de começar o experimento e a cada 12 horas antes da coleta semanal dos peixes, a fim de evitar o acúmulo de matéria orgânica inicialmente nos aquários.



Figura 1: Exemplar juvenil de *Oreochromis niloticus* com 37,5mm.

O delineamento do bioensaio foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. O cloreto de cádmio $\text{CdCl}_2 \cdot \frac{1}{2} 5\text{H}_2\text{O}$ foi escolhido para realizar o teste em bioensaio em *O. niloticus* com base nas informações citadas por Klumpp, Bauer, Franz-Gerstein et al. (2002), Paulo, Fontes e Flores-Lopes (2012), Nassif e Oliveira, (2005) e Souza, Silva, Santana et al. (2009) e pelo fato que diferentes dosagens de cádmio administradas em tratamentos de bioensaio podem vir a promover alterações morfológicas, fisiológicas, histopatológicas, no desempenho e ficarem retidas ou bioacumuladas no fígado Kumar e Singh, (2010), van Dyk, Pieterse e van Vuren (2007), Kaoud e El-Dahshan, (2010), e pelo fato de que peixes expostos a metais pesados podem desenvolver alterações em diferentes regiões do corpo em decorrência da exposição ao metal.

Os tratamentos consistiram em C= controle, com aquários contendo apenas água com um filtro biológico e aeração constante. Nos tratamentos de T1 a T4 foram adicionadas

concentrações finais crescentes de cloreto de cádmio (T1=1, T2=5, T3=10 e T4=15 mgL⁻¹). As concentrações utilizadas no experimento foram estimadas com base na concentração mínima estabelecida na resolução CONAMA 357/2005, na LC50 obtida por Almeida, Novelli e Dal Pai Silva, (2001) que foi de 18,45 mgL⁻¹ e pelas concentrações verificadas na água do rio Cachoeira pelo Centro de Recurso Ambientais (CRA 2001) e de 25 e 50 mgL⁻¹, nos trabalhos realizados por Souza et al., (2009); Nassif e Oliveira (2005) com plantas aquáticas do rio Cachoeira.

O experimento completo foi dividido em duas etapas de acordo com a concentração adicionada. Os tratamentos controle, T1 e T2 foram utilizados para o teste de toxicidade crônica, com a finalidade de testar o efeito da exposição prolongada ao cloreto de cádmio e a bioacumulação desse metal no fígado. Foram utilizados ainda para relacionar a presença deste metal com as prováveis alterações no desempenho produtivo e na ocorrência de alterações histopatológicas observadas neste órgão e no sangue de *O. niloticus*. Já os tratamentos T3 e T4, com concentrações mais próximas da LC50 para esta espécie, foram utilizados para o teste de toxicidade aguda avaliando a mortalidade como resposta de alarme dos indivíduos durante as primeiras 96 horas.

Durante o experimento, a cada 7 dias, foram sacrificados 40 exemplares de *O. niloticus* para análise, sendo 2 indivíduos de cada aquário, totalizando 160 indivíduos ao final do experimento. Antes do sacrifício, os exemplares foram anestesiados com benzocaína comercial (3g/L). Dos dois indivíduos sacrificados em cada aquário, um foi escolhido para a retirada do fígado para análise de bioacumulação e o outro para análise histopatológica, totalizando assim 6 indivíduos de cada tratamento.

Para avaliar efeito da exposição de *O. niloticus* masculinizados aos níveis de cloreto de cádmio sobre o desempenho produtivo foram efetuadas avaliações no ganho de peso (g), crescimento (mm) e sobrevivência dos juvenis para cada tratamento. Além disso, a fim de

verificar o percentual de massa do fígado em relação ao peso corporal foi analisado o índice hepatossomático dos indivíduos para cada tratamento e comparados com as alterações histopatológicas hepáticas encontradas. Os seguintes parâmetros foram considerados:

- Ganho de peso (g) – GP $GP = P_f - P_i$
- Crescimento (mm) – C $C = C_f - C_i$
- Índice hepatossomático (%) – IHS

$$IHS = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso corporal total (g)}}$$

Logo após os indivíduos terem sido sacrificados, foram tomados o comprimento padrão (CP) e o peso total (PT) dos exemplares. Para verificar a variação das concentrações que foram administradas de cloreto de cádmio no início e no final do experimento, foram retiradas amostras de água dos aquários do período de aclimatação no início e no final das coletas. As amostras de cádmio foram analisadas através de Espectrometria de Absorção Atômica com chama – FAAS.

A fim de avaliar o quanto de cádmio que os indivíduos apresentavam em relação ao meio foi utilizado o Fator de Bioconcentração (FBA), uma constante de proporcionalidade que corresponde a razão entre a concentração do composto no organismo e sua concentração na água, no estado de equilíbrio (Barron, 1995), de acordo com a fórmula abaixo:

$$FBA = \frac{\text{concentração do composto no organismo}}{\text{concentração do composto na água}}$$

Os valores encontrados de FBA para cada tratamento foram correlacionados às características observadas nos parâmetros biológicos do desempenho e das alterações histopatológicas durante o período de exposição à substância teste.

Para avaliar o efeito toxicológico agudo do cádmio sobre os exemplares de *O. niloticus*, foi mensurada a mortalidade dos peixes durante as primeiras 72 horas nos tratamentos controle e de maior concentração (10 e 15mgL⁻¹).

Após terem sido anestesiados, os peixes sacrificados foram fixados em formol a 10%. Posteriormente, os fígados foram retirados e conservados em álcool a 70%. Para análise dos tecidos foi utilizada a técnica histológica de rotina de desidratação em álcool etílico para impregnação e inclusão em parafina (Paulo, Fontes e Flore-Lopes, 2012). Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 5 a 7 micrômetros. De acordo com Michalany (1980), foi adotado o método de Hematoxilina e Eosina (HE) para visualização geral dos tecidos e órgão afetado.

As alterações histopatológicas no fígado foram avaliadas semi-quantitativamente pelo grau de alteração tecidual (Índice de Alterações Histopatológicas - IAH) que é baseado na severidade das lesões. Para cálculo do IAH (modificado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994), as alterações em cada órgão foram classificadas em estágios progressivos de danos nos tecidos. Um valor de IAH foi calculado para cada animal pela fórmula: $IAH = (1X SI) + (10X SII) + (100X SIII)$; onde I, II e III correspondem ao número de estágios de alterações 1, 2 e 3 e S representa o somatório do número de alterações de um determinado estágio. Algumas alterações consideradas como leves, inicialmente, foram enquadradas como grau de severidade 1, entretanto, em alguns indivíduos que apresentavam um estágio avançado de lesões leves, estas foram incluídas como moderadas, com grau 2, juntamente com as alterações desta categoria. As alterações severas seguiram o padrão de classificação, sendo enquadradas com grau 3.

Valores do IAH entre 0 e 10 indicaram o funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicaram leves danos ao órgão; entre 21 e 50 indicaram mudanças moderadas no órgão; valores entre 50 e 100 indicaram lesões severas e valores acima de 100 indicaram lesões irreparáveis no órgão (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Baseado na capacidade de reparo do tecido, as lesões foram classificadas em três estágios progressivos: I – reconstrução do tecido é possível (estrutura e função); II – alterações mais severas (efeitos nas funções teciduais); III – restauração do tecido não era mais possível (Tabela 1).

Para verificar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre a variação das concentrações nos tratamentos em relação ao tempo de dosagem, foi utilizada a ANOVA não paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha = 0,05$). Com a finalidade de testar correlação das concentrações do metal nos tratamentos empregados, foi utilizado a análise de correlação de matriz com análise de regressão simples para verificar a relação entre as variáveis. Foram utilizados os programas BioEstat versão 5.0 e Origin versão 8.

Tabela 1: Classificação da severidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de *Oreochromis niloticus*. Modificado de Poleksic e Mitrovic- Tutundzic (1994).

Estágio	Alteração
I	Centro melano macrofágico
	Citoplasma vacuolado
	Forma irregular dos hepatócitos
	Grânulos eosinófilos no citoplasma
	Hipertrofia nuclear
	Hipertrofia celular
	Núcleos irregulares
	Núcleo em posição lateral
	Infiltração de leucócitos
	II
Degeneração do núcleo	
Núcleo picnótico	
Vacuolização nuclear	
Retilinização dos vasos	
III	Retilinização do parênquima
	Necrose focal
	Tumor

4. RESULTADOS

As condições físicas e químicas da água se mantiveram constantes durante todo o período de exposição dos exemplares de *O. niloticus* ao cloreto de cádmio, sem influência sobre os tratamentos (Tabela 2). Dentre os parâmetros analisados, o teste estatístico da ANOVA apresentou diferença estatisticamente significativa para o pH com $p = 0,001$, entre os tratamentos 5, 10 e 15mgL^{-1} em relação ao controle, apesar de seus valores estarem dentro da tolerância permitida para a espécie.

Tabela 2: Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água dos aquários aferidos durante os 21 dias experimentais.

Tratamento	T°C	NH ₃	OD %	OD mg/L	pH
Controle	25,33 ± 1,00	0,02 ± 0,02	84,77 ± 1,88	6,91 ± 0,31	6,38 ± 0,62a
1mgL ⁻¹	25,26 ± 1,13	0,03 ± 0,02	83,95 ± 3,70	6,92 ± 0,34	6,71 ± 0,60a
5mgL ⁻¹	25,13 ± 0,99	0,03 ± 0,06	83,91 ± 2,78	6,93 ± 0,33	7,23 ± 0,20b
10mgL ⁻¹	25,38 ± 1,07	0,04 ± 0,01	83,72 ± 5,17	6,71 ± 0,38	7,16 ± 0,14b
15mgL ⁻¹	25,31 ± 1,02	0,04 ± 0,03	83,14 ± 6,38	6,61 ± 0,42	7,27 ± 0,08b

Mortalidade

Foram observados dois tipos de resposta dos indivíduos após a adição das concentrações de cloreto de cádmio na água dos aquários: 1) resposta de sensibilidade aguda, onde as dosagens de 10mgL^{-1} e 15mgL^{-1} promoveram respostas de exaustão seguidas de morte nos indivíduos nas primeiras 96 horas, e conseqüentemente, as maiores freqüências de mortalidade neste período e 2) resposta de sensibilidade crônica, em que as dosagens

administradas de 1 mgL^{-1} e 5 mgL^{-1} promoveram uma alteração do estado normal dos indivíduos, permitindo uma avaliação da ação da substância tóxica através da ocorrência de alterações nos parâmetros estudados.

De imediato foi verificado hiperatividade dos peixes, com alguns indivíduos apresentando dificuldade na respiração e ventilando na superfície da lâmina d'água. Após 24 horas, foi observada grande mortalidade dos indivíduos expostos as concentrações mais elevadas (10 mgL^{-1} e 15 mgL^{-1}) (Figura 2), assim como em alguns indivíduos expostos a 5 mgL^{-1} , com aumento da ventilação e irrigação sanguínea na região branquial dos sobreviventes e perda do equilíbrio natatório.

Em cada um destes tratamentos, foi observado elevado percentual de mortalidade em um período de 24 horas como resposta a toxicidade ao cádmio (75% em 15 mgL^{-1} e 38,8% em 10 mgL^{-1} e 5,5% no tratamento com 5 mgL^{-1}) (Figura 2). A concentração de 1 mgL^{-1} de cádmio não promoveu mortalidade, sendo esta concentração, portanto, aparentemente tolerável pelos indivíduos.

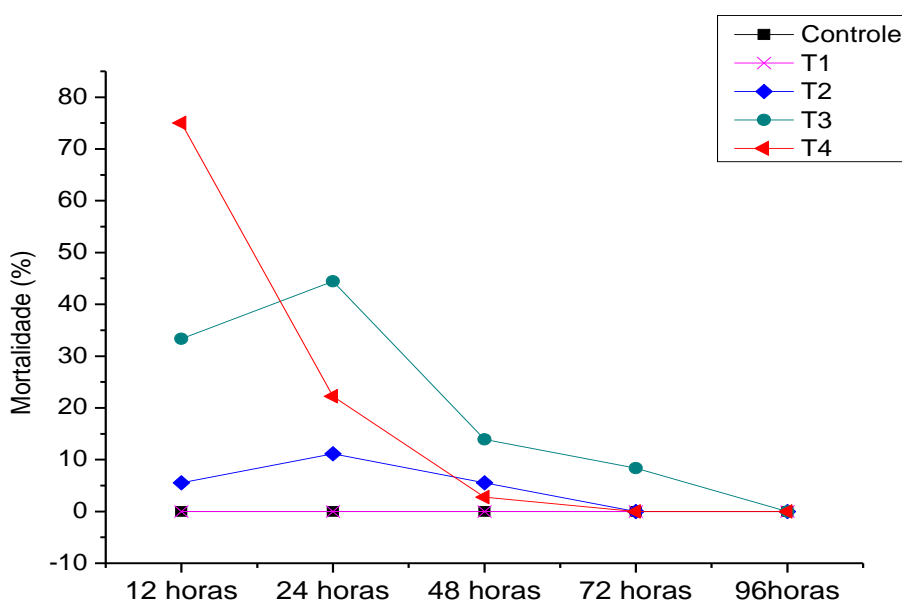


Figura 2: Mortalidade dos indivíduos de cada tratamento durante 96 horas de experimento.

Bioconcentração e bioacumulação

Na avaliação da concentração de cádmio na água foi verificado que houve redução na sua concentração e conseqüentemente na disponibilidade deste metal ao longo do período de exposição. Foi observado que, no tratamento controle, a concentração foi mantida constante, com os valores abaixo do limite de detecção. Já nos demais tratamentos houve uma redução desta substância à medida que aumentava o tempo de exposição, sendo que ao final dos 21 dias do experimento, este elemento foi observado em baixas concentrações na maioria dos tratamentos (Figura3).

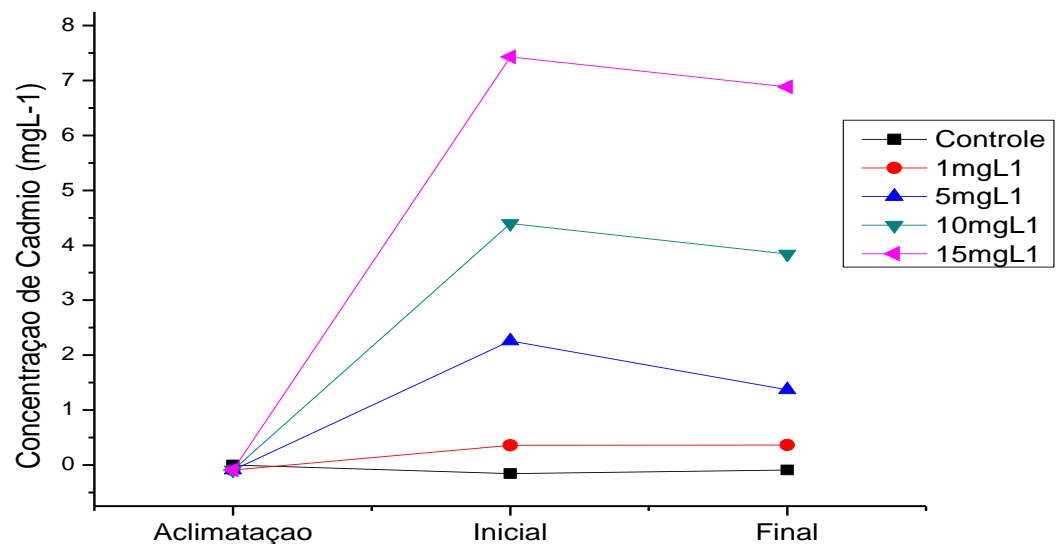


Figura 3: Médias das concentrações de cádmio nos tratamentos durante o período do experimento.

A bioacumulação de cloreto de cádmio nos indivíduos que desenvolveram uma resposta crônica ocorreu de forma progressiva e em ordem inversa à disponibilidade do metal na água, ou seja, à medida que reduzia a concentração do metal na água, ocorria aumento do cádmio no fígado. Desta forma, foi possível verificar que apesar de haver outros fatores que pudessem promover a redução deste metal na água, a bioacumulação do cádmio no fígado foi

considerada estatisticamente significativa, apresentando valores médios de 16,7; 57,3; 98,2 nos indivíduos de 1mgL^{-1} e de 105,0; 136,0 nos de 5mgL^{-1} . (Figura 4). A bioacumulação no fígado apresentou aumento crescente à medida que se aumentava o tempo de exposição. Para a análise de bioacumulação no fígado dos indivíduos de T2 da última semana, devido a morte dos indivíduos que não resistiram à exposição, não houve amostras.

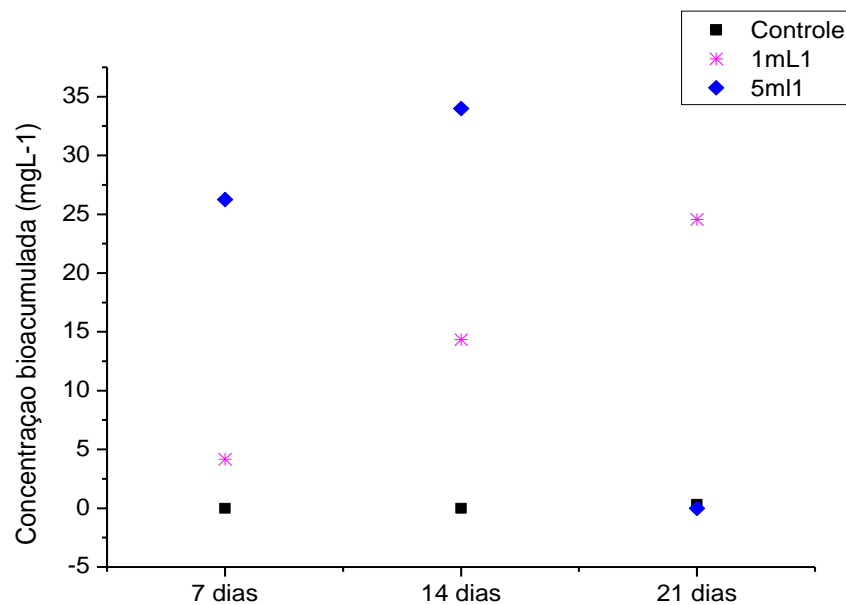


Figura 4: Bioacumulação do cádmio em fígados de *Oreochromis niloticus* durante 21 dias de exposição.

O Fator de Bioacumulação – FBA (Tabela 3) calculado para estes tratamentos mostrou que apesar de os indivíduos estarem expostos a concentrações diferentes, a resposta de bioacumulação foi semelhante nos tratamentos e com 1 e 5mgL^{-1} (46,5 e 46,95) para o período amostral de 7 dias. Já para o 14º dia, houve redução generalizada nos valores de FBA em relação aos valores iniciais, mas com os indivíduos amostrados em T2 apresentando fator de bioacumulação mais elevado que os expostos no T1. Na semana subsequente, a amostragem do tratamento 1 apresentou aumento de 576,4% em relação a bioacumulação da

semana de exposição inicial, sendo que não pôde ser verificado esse aumento nos exemplares do T2, visto que não havia exemplares vivos.

O aumento da bioacumulação também pôde ser verificado na análise de correlação e regressão, que apresentou correlação positiva entre a concentração de cádmio acumulada no fígado de *O. niloticus* em função do aumento da concentração de cádmio nos tratamentos, em que o coeficiente de correlação de matriz apresentou uma associação com $r = 0,7$ ($P < 0,05$) (Tabela 4) e através da análise de regressão também foi observada uma relação positiva entre esta associação, onde 0,42 de bioacumulação de cádmio no fígado pode estar associado a sua concentração na água.

Tabela 3: Fator de Bioacumulação (FBA) do cádmio no fígado de *O. niloticus* durante as três amostragens.

Amostragem	Controle	T1 (1mgL-1)	T2 (5mgL-1)
7 dias	0	46,95	46,50
14 dias	0	19,0	40,4
21 dias	0	270,64	0

Tabela 4: Correlação de matriz da concentração de cádmio na água em função das demais variáveis avaliadas em *O. niloticus*, com nível de significância de 5 % .

	[Cd] água	[Cd] fígado	IHS	Peso	Comprimento
[Cd] água	1				
[Cd] fígado	0,7067	1			
IHS	-0,4898	-0,0947	1		
Peso	-0,6064	-0,4233	0,7801	1	
Comprimento	-0,2207	0,1058	0,9149	0,6101	1

Desempenho

Em concordância com os resultados de bioacumulação, os valores obtidos no desempenho produtivo com o ganho de peso, crescimento e índice hepatossomático – IHS dos indivíduos nos tratamentos também apresentaram influência das diferentes concentrações durante o período de teste. A maior média de ganho de peso, crescimento e IHS (Tabela 5) foi observada no tratamento controle durante todo o período amostral, sendo que neste tratamento, com ausência do cádmio, foi observado maior consumo de ração por parte dos indivíduos, o que provavelmente favoreceu o desenvolvimento corpóreo dos peixes.

Foi verificada diminuição das médias destas variáveis em ambos os tratamentos à medida que se aumentava o tempo de exposição e, ao final dos 21 dias, os indivíduos que apresentaram maior redução nestes parâmetros estavam no tratamento com 5mgL^{-1} . Isto também foi verificado na análise de correlação, que mostrou correlação negativa entre o aumento de massa corpórea em função do aumento da concentração de cádmio nos tratamentos ($r = -0,60$). Os resultados da Kruskal Wallis demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o IHS e ganho de peso de ($p = 0,004$) entre o Controle T1 e T2 ($p = 0,04$), e para o crescimento ($p = 0,04$) entre o Controle e o T2.

Tabela 5: Desempenho de juvenis de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de cádmio (média \pm desvio padrão).

Variável	Tratamento		
	Controle	Cádmio 1 mgL ⁻¹	Cádmio 5 mgL ⁻¹
Peso inicial (g)	0,88 \pm 0,2	0,88 \pm 0,2	0,88 \pm 0,2
Peso final (g)	1,85 \pm 0,15	1,10 \pm 0,15	0,53 \pm 0,37
Ganho de peso (g)	0,88 \pm 0,15a	0,44 \pm 0,15b	0,34 \pm 0,37b
Comprimento inicial (mm)	37,50 \pm 3,3	37,50 \pm 3,3	37,50 \pm 3,3
Comprimento final (mm)	51,44 \pm 2,68	37,49 \pm 11,42	27,68 \pm 18,52
Crescimento (mm)	13,94 \pm 2,68a	10,66 \pm 11,42a	9,8213 \pm 18,52b
IHS	0,02 \pm 0,003a	0,01 \pm 0,002b	0,01 \pm 0,008 b

Ao analisar os valores das médias de ganho de peso para *O. niloticus*, foi observado que os indivíduos do grupo controle apresentavam os valores mais altos do Índice Hepatosomático (IHS) (Figura 5). Em função dos indivíduos deste grupo apresentarem maior massa corpórea que os indivíduos expostos a 1 mgL⁻¹ e 5 mgL⁻¹, durante os 21 dias, este resultado pode estar associado ao maior consumo de ração, e conseqüentemente ao maior ganho de peso e acúmulo de reservas energéticas no órgão. A esta associação foi verificado uma correlação positiva (0,78) entre o IHS e o ganho de peso dos indivíduos, visto que este índice reflete o ganho de massa do fígado sobre o peso corporal. Foi observado que o IHS sofreu pequenas variações entre os tratamentos, com oscilações maiores em relação ao tempo de exposição.

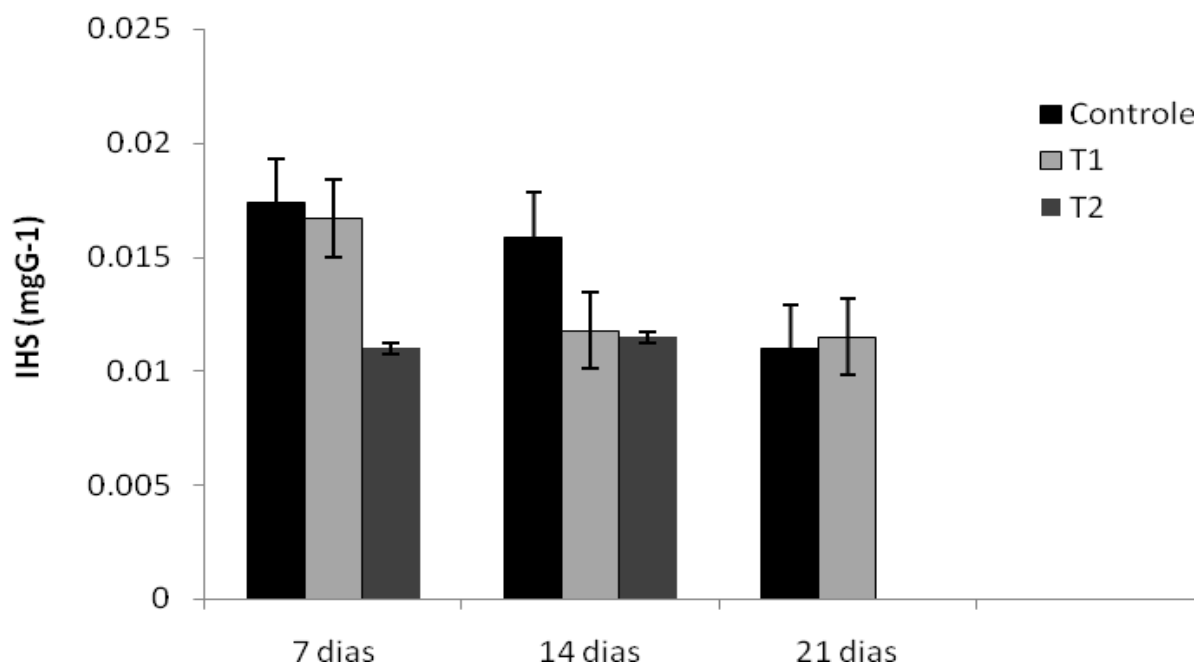


Figura 5: Médias do índice hepatossomático – IHS – ao longo do período de exposição ao cloreto de cádmio.

Foram verificados elevados valores do IHS nos peixes de todos os tratamentos na primeira semana de exposição, o que provavelmente está associado ao consumo alimentar, que foi semelhante em todos os três tratamentos neste período e não influenciado pelas dosagens de cádmio neste período inicial. Com o aumento do tempo de exposição, os indivíduos dos tratamentos 1 e 2 reduziram o consumo e isto pode ter refletido no IHS das semanas subsequentes que também apresentaram um decréscimo.

Histopatologia do fígado

Em relação aos resultados histopatológicos do fígado foi verificado que os exemplares de *O. niloticus* dos tratamentos controle, 1 mgL⁻¹ e 5 mgL⁻¹ apresentavam estrutura semelhante as observadas em outros teleósteos (Figura 6). As alterações que sofreram essa alteração de categoria foram: desestruturação do parênquima hepático, desestruturação do

pâncreas exócrino com suas células apresentando formato irregular; vacuolização citoplasmática; infiltrado de leucócitos, agregados de macrófagos e a quantidade de centros melanos presentes no tecido.

O parênquima hepático normal de indivíduos controle apresentava hepatócitos com forma poligonal núcleo arredondado e citoplasma granular. Nesta espécie, também é comum encontrar o pâncreas exócrino, possuindo em sua conformação normal células poligonais com núcleo central proeminente e arredondado, vários grânulos de secreção no interior do citoplasma e um vaso sanguíneo em posição central ao órgão. Estas células apresentam basofilia quando coradas com hematoxilina e eosina (Figura 6A).

Foram observadas alterações histopatológicas moderadas e severas no fígado dos indivíduos do tratamento controle. A ocorrência deste tipo de alterações em exemplares do grupo controle demonstrou que provavelmente o estresse gerado pelo confinamento e pelo manejo durante o período de cultivo dos indivíduos possam estar associadas ao surgimento de tais alterações nos juvenis, que provavelmente, potencializou o grau de severidade das alterações histopatológicas nos indivíduos expostos ao cádmio. Além disto, foi possível verificar que a exposição ao cádmio reduziu a capacidade de regeneração do órgão, de acordo com a concentração de cada tratamento e o tempo de exposição.

Nos tratamentos (controle, 1 e 5 mgL⁻¹) foram observadas alterações leves (1) - tais como núcleo em posição lateral devido à pressão exercida por grandes vacúolos citoplasmáticos atingindo a maioria do parênquima, infiltrado de leucócitos em regiões de prováveis inflamações ou alergias; moderadas (2) – como hepatócitos e células do pâncreas exócrino em processo de degeneração do citoplasma celular, retilinização dos vasos sinusóides e do parênquima hepático, com disposição dos hepatócitos em cordões; e alterações severas (3) como áreas de necrose de hepatócitos ou de células do pâncreas

exócrinos e o aumento do número de células com a formação de tumor (Figura 6B). A frequência de cada uma das alterações observadas está disposta na tabela 6.

A análise dos exemplares dos tratamentos controle e dos demais tratamentos expostos ao cádmio durante 7 dias mostrou que 100% dos indivíduos apresentavam alterações leves (1) e moderadas(2), sendo que em 25% destes também foi observada a presença de alterações severas (3) como necrose de hepatócitos e de células pancreáticas. Das alterações severas encontradas foi observado principalmente a degeneração de vários hepatócitos em uma mesma área, caracterizando uma necrose focal (Figura 6C), com a presença de 86% dos pâncreas exócrinos em estágio avançado de degeneração em 1 mgL^{-1} e de 95% em 5 mgL^{-1} .

A alta frequência de indivíduos expostos que possuíam fígado com a condição de reparo comprometida, na primeira semana de exposição, mostrou que o cádmio pode ter alterado na recuperação das condições homeostáticas dos indivíduos e potencializado que as alterações leves (1) do fígado se tornassem um tipo de resposta mais severa.

Os exemplares analisados no 14º dia de exposição apresentaram alterações principalmente de gravidade leve (1) e moderada (2) em indivíduos dos tratamentos controle e 1 mgL^{-1} . Foram observadas áreas com agregação de macrófagos fagocíticos e de infiltrado de leucócitos e vacuolização citoplasmática (figura 6E-F) como maior frequência para alterações leves (Tabela 6) em indivíduos de todos os tratamentos. Também foi verificado que 100% dos indivíduos do tratamento com 1 mgL^{-1} apresentavam os pâncreas desestruturados com perda da delimitação celular e granulação citoplasmática, em relação a apenas 25% dos indivíduos controle.

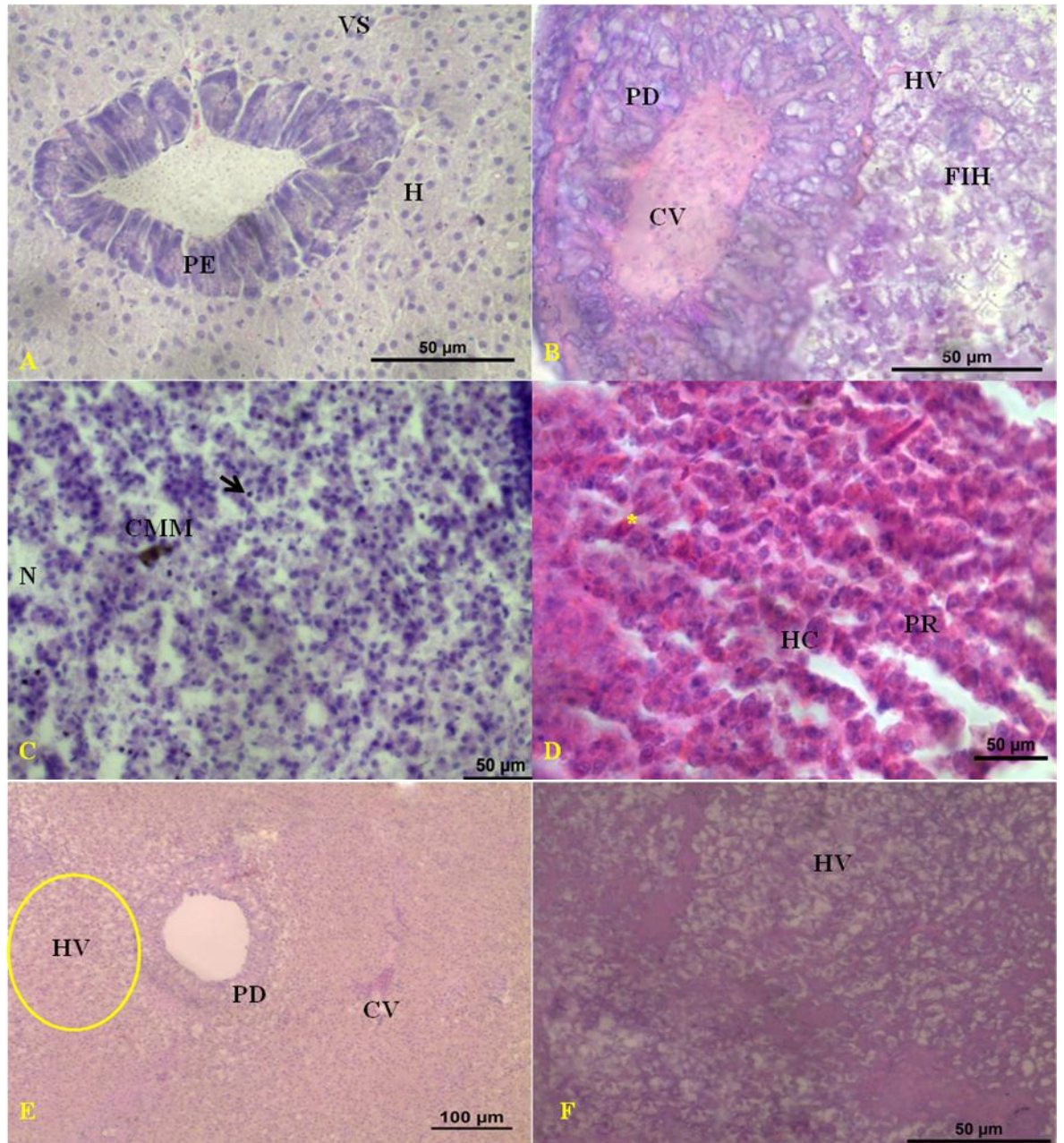


Figura 6: Alterações histopatológicas observadas em *O. niloticus*. a) Fígado normal sem alterações H&E (400X); b-c-e) Fígado com alterações moderadas no parênquima e no Pâncreas exócrino H&E (400X); d-f) Fígado com alterações severas H&E (X). VS – Vaso sanguíneo, H – Hepatócitos, PE – Pâncreas exócrino, PD – Pâncreas em degeneração, HV – Hepatócitos vacuolados, FIH – Forma irregular dos hepatócitos, CV – Congestionamento do vaso sanguíneo, CMM – Centro melano macrofágico, N- Necrose, Seta – Núcleos picnóticos, Asterisco – Infiltração de células sanguíneas, HC Hepatócitos em cordão, PR – Parênquima retilinizado, HV – Hepatócitos vacuolados.

Além disso, a grande quantidade de hepatócitos contendo núcleos com cromatina condensada (figura 6D), bem como vasos sinusóides e células hepáticas organizadas em forma retilínea foram às alterações moderadas prevalentes neste período. Nesta semana não foi observado à presença de alterações severas nos indivíduos. Dos indivíduos expostos a 5mgL^{-1} , 50% apresentavam o desenvolvimento de mais de um foco de células hiperplásicas, provável indício do início de tumores, no mesmo parênquima. Esta alteração severa provavelmente pode ter sido potencializada pela concentração de cádmio no fígado neste período de exposição.

Tabela 6: Frequência das alterações histopatológicas do fígado de *O. niloticus* durante 21 dias de exposição ao cádmio.

	7 dias			14 dias			21 dias		
	C (%)	1mgL^{-1} (%)	5mgL^{-1} (%)	C (%)	1mgL^{-1} (%)	5mgL^{-1} (%)	C (%)	1mgL^{-1} (%)	5mgL^{-1} (%)
Centro melano									
macrofágico	50	50	50	50	66,7	50	50	0	0
Citoplasma vacuolado	75	100	50	25	66,7	0	100	50	0
Forma irregular dos hepatócitos	75	100	50	25	100	0	50	25	0
Forma irregular dos pâncreas	75	100	50	25	100	50	50	100	0
Grânulos lipofucsina no núcleo	25	25	0	25	0	0	50	0	0
Hipertrofia celular	0	0	0	25	0	0	0	0	0
Núcleo em posição lateral	25	0	0	25	0	0	0	25	0
Infiltração de leucócitos	75	75	50	50	100	50	100	25	0
Degeneração do citoplasma	100	75	0	25	66,7	0	50	50	0
Degeneração de cel. do pâncreas exoc.	50	75	100	50	33,3	100	100	100	0
Núcleo picnótico	50	100	50	75	66,7	100	100	75	0
Retilização dos vasos	50	75	50	75	66,7	100	50	0	0
Retilização do parênquima	75	75	50	75	100	100	100	75	0
Necrose focal	25	25	0	0	0	0	0	25	0
Tumor	0	0	0	0	0	50	0	0	0

No 21º dia, os indivíduos do grupo controle apresentaram estabilidade na frequência de alterações leves (15,8%) semelhante à do 14º dia de bioensaio. O prolongado tempo de exposição dos exemplares de *O. niloticus* expostos a 1 mgL⁻¹ provavelmente promoveu a maior frequência de alterações severas nestes indivíduos, com um estágio da lesão mais avançado que o observado nos indivíduos do tratamento controle e expostos a 5 mgL⁻¹ no período de 7 dias. A presença destas lesões, com áreas de morte celular no parênquima hepático caracterizando uma área de necrose, associado a presença de intensa retilinização do parênquima hepático, com pâncreas em degeneração e a grande quantidade de células pequenas com a cromatina bastante condensada (Figura 6D) evidencia a dificuldade na capacidade de reparo órgão.

Os resultados obtidos da análise de intensidade da frequência de alterações em fígados de *O. niloticus* mostraram que os indivíduos do controle, e expostos a 1 mgL⁻¹ e 5 mgL⁻¹ apresentaram alta frequência de alterações moderadas durante os 21 dias de bioensaio. O tratamento controle apresentou predominância de alterações leves e moderadas durante os 21 dias de amostragem (Figura 7).

Os dados da análise semi-quantitativa de IAH dos exemplares do controle, 1 e 5mgL⁻¹ no 7º dia de exposição (IAH = 79,5; 91,5 e 97,0) sugerem que os indivíduos analisados apresentavam um órgão com alta frequência de lesões moderadas e severas que elevaram o índice de alteração nesta semana, classificando o órgão como com sérios danos de estruturação e em consequência disso sendo irreparáveis (Figura 8). Isso mostra que as alterações existentes neste período, provavelmente já estavam presentes no indivíduo antes da realização do experimento ou que a concentração do cádmio nestes tratamentos foi tóxica o suficiente para provocar uma lesão no órgão.

No 14º dia, o resultado do IAH mostrou não haver diferença estatisticamente significativa na severidade das lesões dos órgãos dos indivíduos controle e 1 mgL⁻¹ (IAH = 39,7 e 46,3), com o enquadramento destes órgãos como de severidade moderada e passível de reparação celular, caso às condições de exposição fossem melhoradas. Nesta semana ocorreu uma provável adaptação do órgão destes indivíduos às condições de exposição atuantes neste período. Em contra partida os indivíduos expostos a 5 mgL⁻¹ apresentavam o órgão com condições irreparáveis (IAH =117), não permitindo que houvesse uma melhoria na condição do órgão mesmo que o estresse químico a que estavam submetidos fosse cessado. O tempo de exposição provavelmente influenciou neste resultado.

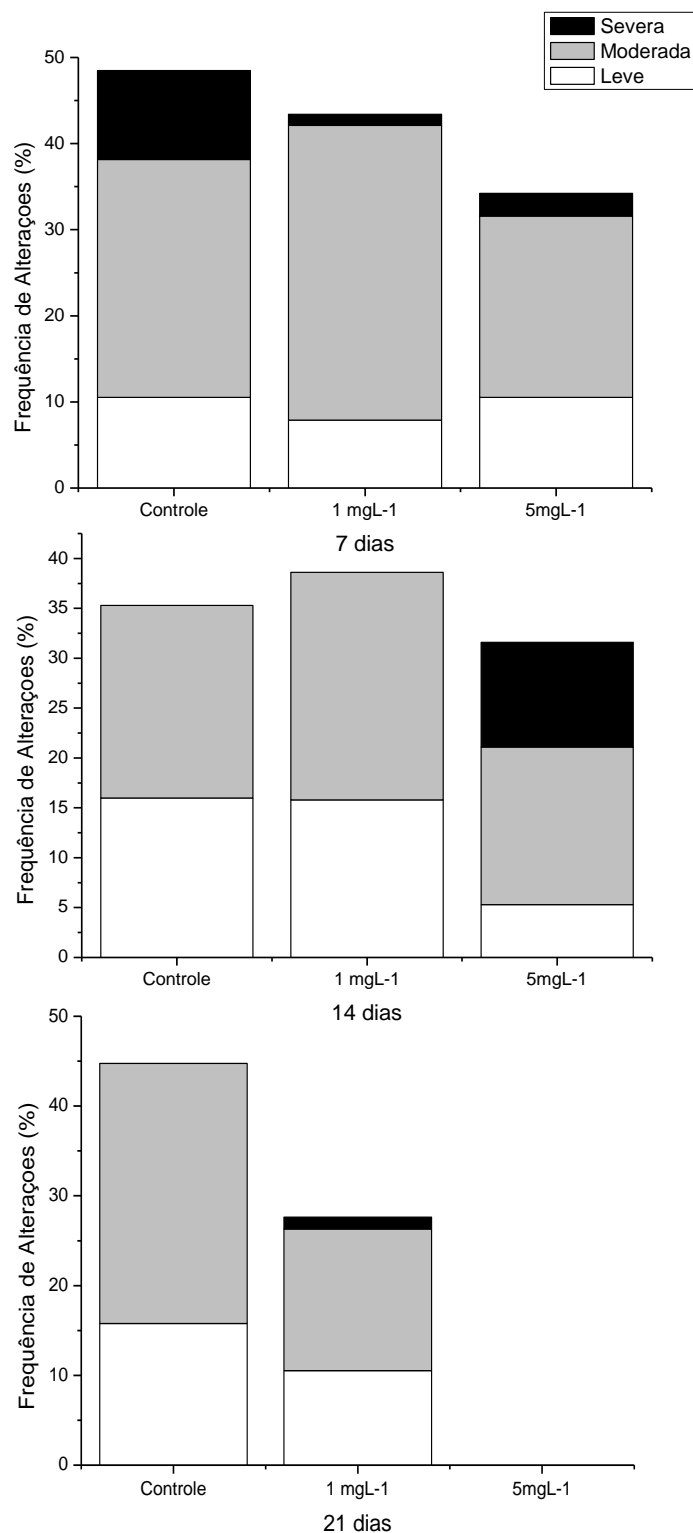


Figura 7: Frequência de intensidade de alterações histopatológicas observadas no fígado de *O. niloticus* dos tratamentos controle e em 1 e 5mgL-1 durante 21 dias de experimento.

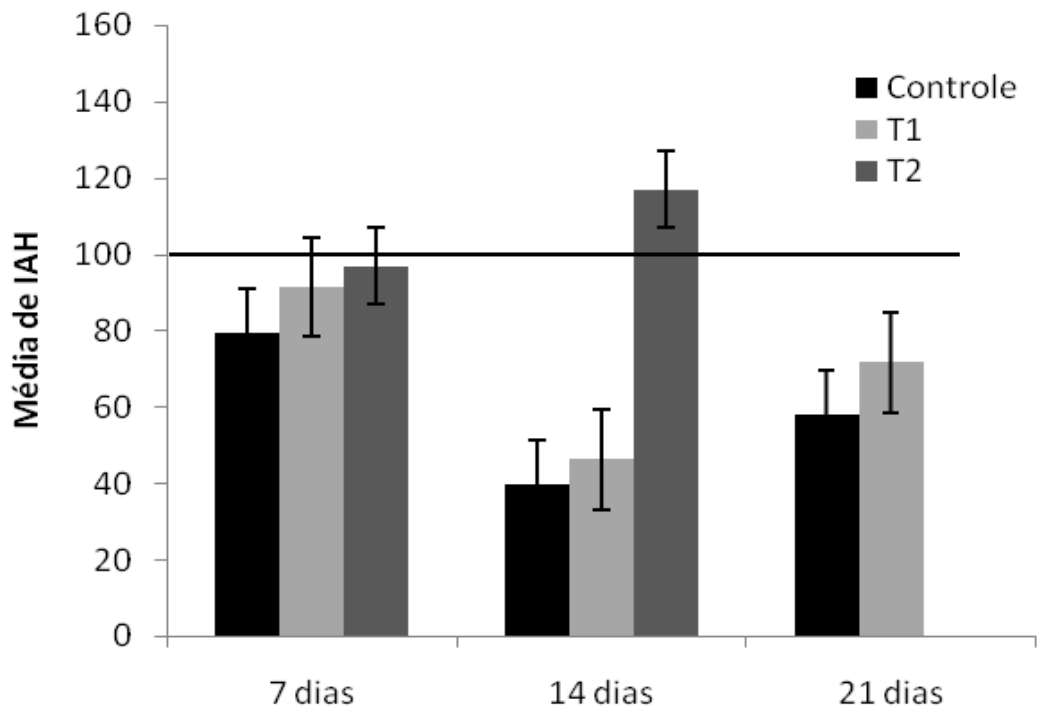


Figura 8: Médias do índice de alterações histopatológicas (IAH) observadas no fígado de *Oreochromis niloticus* dos tratamentos controle e expostos a 1mgL⁻¹ e 5mgL⁻¹ de cádmio durante 21 dias de experimento.

No 21º dia, foi observado que a média de IAH (71,7%) dos indivíduos expostos a 1 mgL⁻¹ foi elevada em função de que apresentavam alterações severas em relação a semana anterior. Entretanto, o órgão tanto dos indivíduos do tratamento controle (IAH = 58%) quanto em 1mgL⁻¹ foram classificados como de gravidade moderada e passível de recuperação.

5. DISCUSSÃO

O cádmio é um metal pesado e possui alta toxicidade em baixas concentrações, apresentando efeitos agudos e crônicos na saúde de animais aquáticos e ecossistemas (Kumar

e Singh 2010). Foi verificado que o cádmio provocou um efeito tóxico em exemplares de *O. niloticus* através da abundante mortalidade dos exemplares às concentrações elevadas do metal e através da avaliação dos efeitos de sua bioacumulação sobre os biomarcadores morfométricos – crescimento, ganho de peso, índice hepatossomático e histopatológico.

Toxicidade aguda ao cádmio

Os resultados deste estudo demonstraram que durante as primeiras 72 horas de exposição às maiores concentrações de cádmio, os peixes apresentaram respostas agudas mais perceptíveis como à natação agitada, com ventilação excessiva e a falta de equilíbrio. Em estudos com *Clarias gariepinus*, Fufeyin, Igetei e Okoidigun et al. (2008) observaram resultados semelhantes encontrados às concentrações de $2,2 \text{ mgL}^{-1}$ de CdSO_4 , em que esses sintomas de hiperatividade foram associados a uma irritação no epitélio dos filamentos branquiais que reduzem a habilidade da brânquia em realizar o transporte de oxigênio para as trocas gasosas. Além disso, Kumar, Prasad, Patra et al. (2007) reportaram que a alta afinidade dos cátions Cd^{+2} pelos cátions Ca^{+2} promove ligações em sítios específicos dos canais de cálcio nas brânquias inibindo a entrada do Zn^{2+} e do Ca^{2+} na mesma, desregulando o controle osmorregulatório da brânquia.

Os efeitos letais das dosagens utilizadas deste metal mostraram que, mesmo *O. niloticus* sendo uma espécie resistente a variações físico-químicas e ambientais, concentrações acima de 5 mgL^{-1} de cádmio são tóxicas o suficiente para provocar a ocorrência de alterações histopatológicas moderadas e severas ou mesmo a morte dos indivíduos, de acordo com o tempo de exposição a esta substância.

Sobha, Poornima, Harini et al. (2007) observaram resultados semelhantes de mortandade em *Catla catla* expostos a partir de 5 mgL^{-1} cádmio, assim como também

verificou que mortalidade era dependente do período de exposição e não apenas da concentração do cádmio, pois a exposição contínua a 2mgL^{-1} já promovia a mortalidade.

Toxicidade crônica ao cádmio

Foi possível observar que, em tratamentos de toxicidade crônica, com baixas concentrações, a bioacumulação de cádmio no fígado apresentou médias elevadas e os exemplares apresentaram alterações expressivas nos parâmetros histopatológicos, crescimento, ganho de peso e índice hepatossomático. Diversos autores verificaram a ocorrência de alterações histopatológicas e no crescimento de indivíduos expostos ao cádmio (Pieterse e van Vuren. 2007; Kaoud e El-Dahshan 2010), e outros relataram sobre a capacidade que os animais possuem de acumular metais a partir da água, material em suspensão, sedimentos e alimentação Prosi (1979) e Zagatto e Bertolletti (2006).

A capacidade bioacumulativa de metais em peixes torna uma condição prejudicial preocupante, visto que o cádmio é um elemento não essencial as funções biológicas dos organismos e que, mesmo em baixas concentrações, pode ser nocivo à vida dos indivíduos, provocando alterações nos mesmos (Abdulla e Chimiecnicka 1990). Além disto, se torna um recurso impróprio para o consumo segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) que estabelece limite de $0,005\text{ mg g}^{-1}$ como valor de referência. Demonstrando desta forma que em casos de contaminação ambiental por este metal peixes expostos a este metal, se tornam recursos impróprios para o consumo, uma vez que, o cádmio fica acumulado em órgão específicos.

Os valores médios de bioacumulação nos exemplares controle e de 1 mgL^{-1} de cádmio no 7º dia ($0; 16,71\text{ mgG}^{-1}$) e 21º dia ($0,0; 98,2\text{ mgG}^{-1}$) mostraram bioacumulação significativa nos indivíduos do tratamento com 1 mgL^{-1} em relação aos indivíduos do controle e ao tempo

de exposição, indicando, desta forma, a influência do período de exposição no aumento da bioacumulação do metal no órgão.

Estudos sobre a bioacumulação de mercúrio em *Mytilus galloprovincialis* apontaram que a bioacumulação de metais é resultante de interações entre fatores fisiológicos, químicos e ambientais, demonstrando que o processo de bioacumulação não depende exclusivamente da concentração do contaminante no ambiente, já que estes contaminantes serão metabolizados dentro dos organismos e posteriormente excretados (Casas e Bacher, 2006). Além disto, outros estudos relatam a importante função da bile na distribuição do metal acumulado no fígado, onde o cádmio se conjuga a proteínas específicas e é excretado para bile que o redireciona ao trato gastrointestinal Allen (1995). Desta forma, a quantidade bioacumulada do cádmio no fígado de *O. niloticus*, não estaria necessariamente totalmente disponível neste órgão para promover alterações.

A atuação de ligação destas proteínas quelantes do metal, como as metalotioneínas que são proteínas específicas de baixo peso molecular e alta afinidade por metais, são reportadas por Silva-Junior, Gomes, Linde-Arias et al. (2012) e Castilho, Martins e Bianchini (2001) como proteínas especialistas em complexar micronutrientes e regular a concentração do metal disponível no fígado e em outros órgãos. Segundo Bianchini, Martins, Pedroso et al. (2003) a atuação das metalotioneínas seguiria o modelo químico de cinética de saturação, em que a velocidade inicial de interação do metal ao seu sítio é medida em função do aumento da concentração deste metal, com o aumento crescente da velocidade de saturação da interação metal-sítio à medida que havia acréscimo na concentração. Desta forma os sítios de ligação se tornariam saturados ao nível máximo de interação com o metal e o órgão reduziria a capacidade em desintoxicar.

Os valores do fator de bioacumulação para os indivíduos expostos a 1 e 5 mgL⁻¹ no 7º dia corroboram com essas observações, pois mostraram que mesmo que os indivíduos

estivessem expostos a altas concentrações, a capacidade inicial de absorção do órgão em acumular o metal foi muito próxima. Essas observações podem ter relação com o processo de regulação de micronutrientes realizado pelas metalotioneínas, pois segundo Silva-Junior, Gomes, Linde-Arias et al. (2012) com o aumento da concentração do metal, a síntese desta proteína quelante seria estimulada no organismo, o que aumentaria a sua concentração em função da presença do metal, já que esta possui a propriedade de se associar aos grupos sulfidrilas e tornar o metal em uma forma não reativa à célula. Desta forma, apesar de ter sido verificado altas concentrações do cádmio, a disponibilidade deste metal poderia não estar necessariamente relacionada à concentração encontrada.

Os resultados da correlação mostraram uma correlação positiva entre a concentração de cádmio na água e a concentração acumulada no fígado, além de uma baixa correlação entre o cádmio da água e o ganho de peso. Isto demonstrou que a quantidade acumulada estava estritamente relacionada com a quantidade disponível no ambiente, uma vez que a porcentagem de variação R^2 , na análise de regressão linear, mostrou que 42,79% de bioacumulado de cádmio no fígado está associado à concentração na água. Entretanto, o aumento desta concentração na água não favoreceu o aumento de massa corpórea dos indivíduos, evidenciando que esta concentração pode vir a afetar o desempenho produtivo, promovendo uma redução no ganho de peso dos indivíduos.

A alta bioacumulação de cádmio no fígado de *O. niloticus* nesta concentração pode estar associada a vários fatores, desde a ação das metalotioneínas sequestrando o metal, a atuação da bile na excreção de metais conjugados às metalotioneínas e redistribuindo no fígado e intestino (Allen, 1995) até a função antagônica exercida pelo cádmio em relação às ligações ao sítio ativo de algumas proteínas que se associam aos elementos traços essenciais como o Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} que atuam no desenvolvimento corpóreo (Wright e Frain, 1981; Kumar e Singh 2010) e principalmente a condição de saúde que se encontram os indivíduos.

Segundo Lim, Klesius, Li et al, (2000) a substituição de elementos essenciais como o ferro pelo cádmio promove uma condição de fome ou inanição ao indivíduo, podendo desencadear na falta de apetite, redução no consumo, redução na conversão alimentar e conseqüentemente na diminuição do crescimento dos peixes. Chattopadhyay, Mukhonadhyay e Durgapur (2006) relataram que o zinco influencia na assimilação dos nutrientes e conseqüentemente no desempenho alimentar dos indivíduos, e que a substituição deste elemento pelo cádmio também pode vir a influenciar neste processo de assimilação. Desta forma, no presente estudo, altas concentrações de cádmio estariam atuando antagonicamente ao hormônio e inibindo o crescimento e o ganho de peso.

Outra resposta crônica observada nos indivíduos expostos a concentrações de 1 mgL^{-1} e 5 mgL^{-1} de cádmio foi à redução nos valores do IHS em relação aos indivíduos do grupo controle, sendo que os de 5 mgL^{-1} apresentaram maior redução de massa do fígado em relação a seu peso total. Essa redução do IHS pode ter ocorrido devido à atuação do cádmio na diminuição de fontes energéticas no fígado, como o glicogênio, já que o índice hepatossomático é uma forma de quantificar o estoque de energia – glicogênio do fígado (Cyrino, Pórtz e Martino. 2000); Navarro, Silva, Ribeiro Filho et al. (2006) e uma diminuição nos níveis de glicogênio com conseqüente aumento da concentração de glicose, como a que foi observada por Sobha, Poornima, Harini et al. (2007), em *Catla catla* expostos a $4,5 \text{ mgL}^{-1}$ de cloreto de cádmio está associada a redução a um provável consumo da reserva de glicogênio para atender ao estresse promovido pela exposição ao metal.

Sobha, Poornima, Harini et al. (2007) afirmaram que os teores de glicogênio são, normalmente, encontrados em concentrações mais elevadas no fígado, uma vez que este é o órgão principal do metabolismo de carboidratos em animais, de armazenamento e exportação de unidades de hexose para a manutenção da glucose no sangue. Na tentativa de promover

uma desintoxicação ou na transformação do contaminante, a atuação deste órgão no armazenamento e metabolismo pode influenciar nas concentrações finais do contaminante.

A redução nos valores do índice também pode ter sido influenciada pela quantidade de lipídios armazenados no fígado durante o período de reversão sexual, pois foi verificado na análise histopatológica uma alta frequência de indivíduos com vacuolização citoplasmática nos exemplares do grupo controle (75 e 25%) e dos expostos a 1 mgL^{-1} (100 e 66,7%) nas duas primeiras semanas de exposição, em relação à baixa frequência de vacuolização citoplasmática nos fígados de indivíduos de 5 mg^{-1} (50 e 0%) no mesmo período. Em contrapartida, Figueiredo-Fernandes, Ferreira-Cardoso, Garcia-Santos et al. (2007) observaram em *Oreochromis niloticus* que o aumento da concentração de cobre refletia no aumento do IHS de indivíduos machos e fêmeas com as condições de sexualidade normais, ou seja, não revertidas sexualmente, e também associou essa elevação do IHS ao aumento do volume celular devido à presença de lipídios.

A vacuolização citoplasmática geralmente está associada ao armazenamento de lipídeos dentro de vacúolos e isto pode ser uma condição normal para Fanta, Rios, Romão et al. (2003), ou ocorrer como um indicador de estresse ou alta demanda energética, ou à presença de alguma substância química (Paulo, Fontes, Flores-Lopes, 2012; Kumar, Prasad, Patra et al., 2007), entretanto, a redução na quantidade de vacúolos de gordura armazenada no fígado dos indivíduos expostos a 5 mgL^{-1} já seria provavelmente, em decorrência da ação inibitória do cloreto de cádmio demonstrando desta forma que esta concentração pode atuar sobre outras atividades bioquímica da célula.

Análise histopatológica

Foi observada a influência da toxicidade do cádmio sobre a sobrevivência dos exemplares, uma vez que foi verificada uma mortalidade dos mesmos a partir da adição do

cloreto de cádmio. Os resultados da análise histopatológica demonstraram uma elevada frequência de alterações no fígado dos indivíduos em todos os tratamentos, incluindo o grupo controle. Estes resultados demonstraram que, provavelmente, os mesmos já apresentavam o fígado comprometido antes da realização do experimento. A ocorrência destas alterações provavelmente está associada à adição de hormônios masculinizantes na ração que é administrada para os peixes durante as primeiras semanas de vida destes indivíduos.

Farombi, Adelowo e Ajimoko (2007) reportam o fígado como um órgão importante na desintoxicação armazenamento, transformação e ou redistribuição dos contaminantes, além de ser um importante sítio para desenvolver efeitos patológicos induzidos por contaminantes. A elevada bioacumulação do cádmio no fígado observada nos valores de FBA possibilitou o desenvolvimento de alterações histopatológicas em *O. niloticus*, como sendo respostas patológicas potencializadas pelo cádmio.

O efeito da toxicidade do cádmio foi observado nas análises histopatológicas do fígado, em que a alta frequência de alterações moderadas e severas em indivíduos de *O. niloticus* provavelmente foi em decorrência da ação do metal, que potencializou a severidade das alterações já existentes no órgão.

As análises histológicas de indivíduos controles mostraram a presença de alterações em todos os estágios de severidade no 7º dia de exposição, sendo que duas das alterações classificadas como leves apresentaram relação com o acúmulo de lipídios no órgão ou a presença de estresse por substâncias químicas. Das alterações, a vacuolização nos hepatócitos foi observada em 75% dos indivíduos e, segundo van Dyk, Pieterse e van Vuren (2007), esta alteração pode ser considerada como patológica visto que há aumento na quantidade de células vacuoladas com acúmulo de lipídios nos vacúolos, podendo promover esteatose.

A segunda alteração observada foi à presença de grânulos marrons de lipofuscina no citoplasma celular, observadas em 25% dos exemplares. Esses grânulos são conhecidos como

pigmento do desgaste celular, pois sua presença sugere que há lesões por radicais livres e peroxidação de lipídios nesta célula e geralmente é observado em células que estão sofrendo alterações degenerativas lentas (van Dyk, Pieterse e van Vuren, 2007). Estes resultados corroboram com as altas médias de IHS nos indivíduos do controle e de maior concentração do cádmio (5 mgL^{-1}), cujo aumento do peso do fígado seria em função da elevada frequência destas alterações decorrentes dos lipídios hormonais e acrescidos de síntese estimulada pelo cádmio.

As alterações mais severas foram observadas em indivíduos expostos a 5 mgL^{-1} no 14º dia e em 1 mgL^{-1} no 21º dia, com o desenvolvimento de dois tumores em estágios iniciais e grandes focos de degeneração e morte celular, respectivamente. As alterações observadas no 21º dia corroboram com os resultados de IAH que demonstraram crescimento na severidade das alterações histopatológicas verificadas nos indivíduos desta concentração, o que indicou que a toxicidade do cádmio agravou a lesão.

Kaoud e El-Dahshan (2010) observaram focos de necrose dos hepatócitos e núcleos picnóticos na maioria do parênquima hepático e consideraram estas alterações como sendo resultante da ação de desintoxicação do órgão, através da atuação das proteínas metalotioneínas se ligando ao cádmio no núcleo da célula. Mella, Randi, Ventura et al. (2007) e Figueiredo-Fernandes, Ferreira-Cardoso, Garcia-Santos et al. (2007), também observaram resultados de necrose-degenerativa em *Hopllias malabaricus* expostos ao metilmecúrio e em *O. niloticus* expostos ao cobre, demonstrando a ação tóxica destes metais pesados sobre a célula, quando a capacidade de ligação do metal às proteínas tioneínas e a desintoxicação do órgão se encontra abaixo da capacidade metabólica, comprometendo provavelmente, a habilidade de regeneração.

Além da relevância das alterações severas, a alta frequência de alterações moderadas demonstrou que o órgão desenvolveu respostas contínuas à presença dos contaminantes, nos

indivíduos expostos a duas concentrações diferentes por um mesmo período e apresentaram um aumento na severidade de acordo com o tempo de exposição. Os resultados do IAH também refletiram essa alta frequência em todas as semanas, evidenciando que as condições e o tempo de exposição ao cádmio estavam promovendo continuamente o agravamento da lesão a estágios de severidade mais avançado.

Com a condição homeostática alterada devido à quantidade de metal acumulada, os indivíduos provavelmente desencadearam sintomas letais, tanto no sistema respiratório, quanto hepático, o que também foi reportado por Kumar, Prasad, Patra et al. (2007). Sobha, Poornima, Harini et al. (2007) relataram que, mesmo que indivíduos expostos ao metal pesado sobrevivam inicialmente à exposição, os danos causados pela exposição progressiva, mesmo em pequenas doses, podem vir a se manifestar em fases posteriores. Desta forma, a acumulação do cádmio no fígado foi suficientemente tóxica para provocar alterações de resposta alarme no período preliminar de exposição, e respostas de exaustão ao longo da vida do animal, por comprometer a atividade celular e subsequentemente no funcionamento do órgão.

Da mesma forma, peixes em seu ambientes natural podem ser alvos de exposição de metal por esgotos ou agrotóxicos e detergentes (Nassiff e Oliveira 2005), e ao serem consumidos por comunidades ribeirinhas, ou por outros consumidores da teia trófica, podem vir a desenvolver respostas patológicas potencializadas pela atuação direta, ou sinérgica deste contaminante. Este fato tem grande importância na saúde pública para o desenvolvimento de estudos relacionados ao uso e destino destes contaminantes químicos, uma vez que peixes são fonte de alimentação humana e a sua condição de saúde pode refletir às condições do ambiente.

A concentração subletal considerada mais tóxica foi a de 5 mgL^{-1} , em função de ter potencializado o desenvolvimento de alterações que comprometeram o tecido hepático e o

desempenho e inibiram o crescimento, o ganho de massa corpórea e a sobrevivência destes indivíduos. Esta concentração pôde ser enquadrada como altamente tóxica para os indivíduos, uma vez que 22% dos indivíduos não conseguiram sobreviver por muito tempo à exposição ao cádmio, devido a diminuição da resistência do organismo à toxicidade do metal e aos sobreviventes houve o desenvolvimento inicial de respostas adaptativas de alarme, e ao longo do período respostas de exaustão do órgão ao efeito do metal. .

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que o conjunto de biomarcadores utilizados para avaliar o potencial tóxico do cádmio em *O. niloticus* foi considerado eficiente para diagnosticar o efeito do metal nos organismos. A eficácia pode ser comprovada em função do cádmio ter sido acumulado nos indivíduos e desencadeado respostas em todos os parâmetros estudados, principalmente como consequência do período de exposição. Este tipo de informação pode servir como ferramenta de avaliação preditiva da ação destes compostos sobre os indivíduos que estão presentes no ambiente natural.

6. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que as concentrações utilizadas foram extremamente tóxicas para *O. niloticus* e possibilitaram o desenvolvimento de alterações histopatológicas no fígado, uma vez que, na análise de toxicidade crônica foram observadas alterações em todos os parâmetros analisados, o que faz com que, os valores normalmente utilizados e estabelecidos para LC₅₀ para o período de vida dos indivíduos analisados devem ser revistos.

Também foi possível concluir que as concentrações de 1 e 5mgL⁻¹ de cádmio influenciaram negativamente na manutenção da sobrevivência e no crescimento do desempenho produtivo, através da alta mortalidade e da redução do ganho de peso e do crescimento dos indivíduos, verificado principalmente na concentração a 5mgL⁻¹. Além disto, foi observada que a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos considerada com o uma

condição patológica influenciou também no índice hepatossomático, demonstrando, portanto, que a avaliação histopatológica pode contribuir para inferências zootécnicas quanto à qualidade de vida e do desempenho dos peixes.

Desta forma, os resultados observados podem ser muito úteis quando extrapolados para uma condição de ambiente natural, no qual a presença de várias substâncias químicas de várias origens, quando associadas a metais como o cádmio, pode promover ou potencializar alterações nos indivíduos a um grau de severidade avançada, influenciando na sobrevivência dos mesmos e conseqüentemente na estrutura da população.

REFERÊNCIAS

ABDULLA, M.; CHIMIECLNICKA, J. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure toxic metals. Biology. Trace Element Res. v. 23.1990. n. 2, p. 25-53.

ALLEN, P. Accumulation profiles of lead and cadmium in the edible tissues of Oreochromis aureus during acute exposure. Journal of Fish Biology. v.47. 1995.p. 559-568.

ALMEIDA, J. A.; NOVELLI, E. L. B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Environmental Pollution. v114. 2001. p. 169- 175.

ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C. **Gestão Integrada de Mananciais de abastecimento Eutrofizados**. Sanare: Revista Técnica da Sanepar. v.12. 2005. p 31-42.

BARRON, M.G. **Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms**. In: HOFFMAN, D.J. ; RATTNER, B.A. ; BURTON, G.A., Jr.; CAIRNS, J., Jr. (1995) *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, Lewis Publishers. Cap. 30, 1995. p. 652-666.

BIANCHINI A, MARTINS SE, PEDROSO MS, SAID JS, SPENGLER A. **Biotic ligand model in fresh and sea water in Brazil**. In Lagos GE, Warner AEM, Sánchez M, (Eds.). Health, environment and sustainable development. Proceedings of the Copper, The 5th International Conference, Santiago, Chile. v. 2. 2003. p. 543-552.

BOLLMANN, H. A. **Relação entre a densidade populacional e parâmetros da qualidade das águas superficiais em bacias hidrográficas urbanas**. Tese de Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos – Instituto de Pesquisa Hidráulica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2003. p.145

BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. **Nutritive metal uptake in teleost fish**. Journal of Experimental Biology. v. 206. 2003. p.11 – 23.

CASAS, STELLIO.; BACHER, CEDRIC. **Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring**. Journal of Sea Research, v.56. n.2. 2006 p.168-181.

CAIRNS JR, J.; PRATT, J. R. **The scientific basis of bioassays**. v 2. 1989. p. 5- 20.

CAMPOS, M. L.; SILVA, F. N.; FURTINI NETO, A. E.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J ANTUNES, A. S. **Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel,**

chumbo e zinco em fosfatos de rocha. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. v. 40. 2005. p. 40.

CHATTOPADHYAY, B.; MUKHOPADHYAY, S.K.;DURGAPUR.**Trace metal distribution in tissues of cichlids (*Oreochromis niloticus* and *O. mossambicus*) collected from wastewater-fed fishponds in East Calcutta Wetlands, a Ramsar site India.** Acta Ichthyologica et Piscatoria. n. 2. v. 36. 2006. p. 119-125.

CYRINO, J. E. P.; PÓRTZ, L.; MARTINO, R. C. I. **Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus Salmoides*.** *Scientia Agricola*. v.57. 2000. p. 609-616.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº. 357, de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em 14/05/2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº 344, de 25 de março de 2004. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em 14/05/2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº. 421, de 03 de fevereiro de 2010. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em 14/05/2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº. 430, de 13 de maio de 2011. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama>. Acessado em 14/05/2012.

CRA - CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS: CADERNO DE REFERÊNCIA AMBIENTAL– **Ecotoxicologia do cádmio e seus efeitos.** Salvador: ISBN 85-88595-04-4. v.6. 2001. p. 122.

CRA - CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS: CADERNO DE REFERÊNCIA AMBIENTAL– **Bacias hidrográficas do Leste.** Salvador. 2001. p. 339 – 356.

DECAPRIO, A.P. **Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment.** Environmental Science Technology. v.31, 1997. p.1837-1848.

DEPLEDGE, M.H. **Genotypic toxicity implications for individuals populations.** Environmental Health Perspectives. v. 102, 1994. p. 101–104.

EGREJA FILHO, F.B. **Avaliação da ocorrência e distribuição dos metais pesados na compostagem de lixo domiciliar urbano.** 1993. 176 p. Dissertação apresentada ao Mestrado em Agronomia e Agroquímica - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANA, A.C.C.;FREIBER, S. **Histopatology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v.54. 2003 p. 119-130.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, A.; AJIMOKO, Y. R. **Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in african cat fish (*Clarias gariepinus*) from nigeria ogun river.** International Journal of Environmental Research and Public Health. v.2, n. 4, 2007.p.158-165

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; MONTAÍNHAS-FERNANDES.

Histopathological changes in liver and

gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper.

Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 27. n. 3. 2007. p.103-109.

FUFYIN, P. T. IGETEI, J.; OKOIDIGUN. **Changes in the catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to acute cadmium lead poisoning.** Bioscience Reseach Communications. v. 20. 2008. p. 271 – 276.

FUKUSHIMA, A. R.; AZEVEDO, F. A.. **História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro**, Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade. vol.1, n.1. 2008. p 2-32.

GAYÃO, A L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de tilápia do nilo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. p.100. Tese apresentada ao Doutorado em Aquicultura - Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Campus Jboticabal.

HOSE, J.E., MCGURK, M.D., MARTY, G.D., HINTON, D.E.; BROWN, E.D. BAKER, T.T. **Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos larvae: morphological, cytogenetic, histopathological assessments**. Canadian Journal Fish Aquatic Science. v. 53. 1996. p 2355 – 2365.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. VEIGA. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg)**. A Ecologia Brasileira. n 4. v. 12. 2008. p. 680 – 693.

KAOUD, H. A.; EL-DAHSHAN, A. R. **Bioaccumulation and histopatological alteration of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish**. Nature and Science. v 8. n 4. 2010. p 147-156.

KLUMPP, A.; BAUER, K.; FRANZ-GERSTEIN, C MENEZES, M.; **Variation of nutrient metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil)**. Environment Internationa., v. 28. 2002. p 165-171.

KUMAR, P.; PRASAD, Y.; PATRA AK.; SWARUP, D. **Levels of cadmium and lead in tissues of freshwater fish (*Clarias batrachus* Linneaus) and chicken in western UP (India)**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v 79. n 4. 2007. p 396-400.

KUMAR, P.; SINGH, A. **Cadmium toxicity: an overview**. Green Earth Research Foundation Bulletin of Biosciences.v.1. n 1. 2010. p. 41-47.

LIM, C.; KLESIUS, P.H.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H. **Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to Edwardsiella ictaluri challenge**. Aquaculture, Amsterdam, v.185. 2000. p. 313-327.

MASON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. Ed. 2. John Willey and Sons, 1991. p. 351.

MELLA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. **Effects of dietary methylmercury on liver kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus***. Ecotoxicology Environmental Safety. v. 68. 2007. p 426–435.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em Anatomia Patológica, com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo, Editora Pedagógica Universitária.1980. p. 277.

MOURA R.M . **Agrotóxicos: Heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber**. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica,Recife.vol. 4. 2007. p.23-49.

NASSIF, R. H. M. S.; OLIVEIRA. A, H. **Estudo da distribuição de cádmio em plantas aquáticas utilizando o ICP-MS**. International Nuclear Atlantic Conference – INAC. Santos, SP, Brasil. *Associação Brasileira de Energia Nuclear*. v 85. 2005. p 141-150.

NAVARRO, R. D.; SILVA, R. F.; RIBEIRO FILHO, O. P.; CALADO, L. L.; REZENDE, F.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, L. C. **Comparação morfométrica e índices somáticos de**

machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. Zootecnia Tropical. v.24. n. 2. 2006. p.22-33.

OLURIN, K.B.; OLOJO, E.A.A.; MBAKA, G.O.; AKINDELE, A.T. **Histopathological responses of the gill liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate.** African Journal of Biotechnology. v. 24. 2006. p. 2480-2487.

PAULO, D. V.; FONTES, F. M.; FLORES-LOPES, F. **Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* as a tool of environmental evaluation of Cachoeira River, BA.** Brazilian Journal of Biology, n. 1. v.72, 2012. p.131 - 140.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal chronic effects of pollution.** In: R. Müller & R. Lloyd (Eds.) Sublethal Chronic effects of Pollutants on Freshwater Fish. Cambridge. Cambridge University Press. UK. 1994. p. 339 - 352.

PROSI, E. **Heavy metals in aquatic organisms.** In: Förstner, U., Wittmann, J.T.W. (Eds.), Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer, Berlin. v.1. 1979. p. 271–323.

RODRIGUES, L. C. **Bioquímica sistema de biotransformação de xenobióticos.** Tese Doutorado em Ciência Biológica – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003. p. 176.

SCHMALZ, W.F.; HERNEZ, A.D.; WEIS, P. **Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*.** Marine Environment. v. 54. 2002. p. 539–542.

SILVA-JUNIOR, D.R.; GOMES, V.S.; LINDE-ARIAS, A. R.; VIANNA, M.

Metallothionein in the pond perch *Diplectrum radiale* (Teleostei) as a biomarker of

pollution in Guanabara Bay estuary, Brazil. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. v. 7. n. 1. 2012. p 83-88.

SINGH, A.; SHARMA, R.K.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F. M. **Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India** Tropical Ecology. v. 51. 2010. p. 75-387.

SOBHA, K.; POORNIMA, A.; HARINI, P.; VEERAI AH, K. **A study on biochemical changes in the fresh water fish, *Catla catla* (Hamilton) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride.** Kathmandu University Journal of scienc, enginnering and technology. n4. v 1. 2007.p 1-11.

SOUZA, VL.; SILVA, DC.; SANTANA, KB.; MIELKE, MS.; ALMEIDA, AAF.; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. **Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas.** Acta Botanica Brasilica, v 4. 2009. p. 343 -354.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Report on ecological risk assessment guidelines: strategic planning workshop.** EPA/630/R-92-002. Washington, DC. 1992. p. 57.

VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VAN VUREN, J. H. J. **Histopatological change in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 66. 2007. p.432-440.

VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL.; V. M. F. **Estresse em peixes –Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; LUQUE, J.L. Parasitological hematological analysis in Nile tilápia *Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. Acta Scientiarum. v 27. n.3. 2004. p. 231-237.

VALAVANIDIS. A.; VLACHOGIANNI. T. **Metal Pollution in Ecosystems. Ecotoxicology Studies Risk Assessment in the Marine Environment.** Science advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology Issues. v 1. 2000. p. 3-14.

WRIGHT, DA.; FRAIN, JW. **The effect of calcium on cadmium toxicity in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex*.** Archive Environmenter Contamination Toxicology. v.10. n 3. 1981. p. 321-328.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cadmium. (Environmental Health Criteria, 134). Geneva. Acesso em 30/11/2011. 1992.

XIMENES, J. F. **Enciclopédia Ambiental** – Poluição Industrial. Disponível em: <http://www.encyclopediambiental.hpg.ig.com.br>. 2006.

ZAGATTO. P.A.; BERTOLETTI. **Ecotoxicologia Aquática** – Princípios e Aplicações In: Ecotoxicologia. ZAGATTO & BERTOLETTI. 2006. Eds. São Paulo. v. 1. 2006.p. 413-427.