

SUELLEN SILVA CONDESSA

**ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO PELO CROMO
HEXAVALENTE E AÇÃO DA VITAMINA C EM
Astyanax aff. bimaculatus (TELEOSTEI: CHARACIDAE)
MACHOS ADULTOS E POTENCIAL BIOSSORTIVO DA
CASCA DE COCO VERDE (*Cocos nucifera* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Condessa, Suellen Silva, 1984-
C745e Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação
2014 da vitamina C em *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei:
Characidae) machos adultos e potencial biossortivo da casca de
coco verde (*Cocos nucifera* L.) / Suellen Silva Condessa. –
Viçosa, MG, 2014.
xxx, 172f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juliana Silva Rocha.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.146-172.

1. Metais pesados. 2. Peixe. 3. Bioacumulação.
4. Histopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 622.752

SUELLEN SILVA CONDESSA

Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação da vitamina C em *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei: Characidae) machos adultos e potencial bioativo da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de maio de 2014.

Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo

Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Ita de Oliveira e Silva

Sérgio Luís Pinto da Matta

Juliana Silva Rocha
(Orientadora)

*“Era um caminho que de tão velho, minha
filha,
já nem mais sabia aonde ia...
Era um caminho
velhinho,
perdido...
Não havia traços
de passos no dia
em que por acaso o descobri:
pedras e urzes iam cobrindo tudo.
O caminho agonizava, morria
sozinho...
Eu vi...
Porque são os passos que fazem os
caminhos!”*

Caminho - Mario Quintana

Dedico...

Aos amados:

Pais, Zilda e Washington;

Marido, Luís Conrado;

Minha irmã, Soraya.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter colocado pessoas de bem no meu caminho, por ter me dado força e saúde para realizar mais um sonho!

Aos meus pais, Zilda e Washington, pelo amor incondicional, carinho, incentivo, exemplo de vida, palavras de conforto. Por sempre apoiar minhas escolhas e não medir esforços para me ajudar a concretizar meus sonhos. Amo vocês mais do que tudo!

À minha irmã pelo carinho, amor e estímulo. Amo demais!

Ao meu marido, Luís Conrado, pela compreensão, paciência, amor, palavras de conforto e incentivo, fidelidade a mim nestes anos que passamos “separados”. Por apoiar minha escolha de ir para Viçosa, em busca do meu sonho, mesmo não gostando da ideia. Te Amo!

Aos meus familiares (tias, tios, primos, primas, vó) pela força, orações e incentivo.

Aos amados sogros, Fátima e José Conrado, cunhados Laila, Leo, Laura e Flávio, e ao Cauãzinho, pelo carinho, orações e torcida.

À Universidade Federal de Viçosa por ser tão acolhedora e me receber tão bem. Por ter me permitido *Estudar, Saber, Agir e Vencer!*

Ao querido Prof. Sérgio Luís P. da Matta. Chegar até aqui só foi possível porque você “abriu as portas” do laboratório de Biologia Estrutural há 7 anos, quando iniciei meu estágio na histologia. Muito obrigada pelos ensinamentos, momentos de descontração, pela paciência, incentivo, confiança e pela amizade. Muito obrigada!

À querida orientadora Prof.^a Juliana Rocha pelo profissionalismo, orientação, confiança, paciência e acima de tudo pela amizade nestes anos de convivência que foram essenciais para o meu crescimento, aprendizado e indispensáveis para a realização deste estudo. Muito obrigada!

À super equipe: Prof.^a Juliana Rocha, Prof. Sérgio da Matta, Prof. Juraci Alves, Prof. Jorge Dergam, Jefferson Viktor, Silvino, Thamires, Érica, Marli, Kyvia, Jerusa e Pollyanna, sem vocês este estudo não teria se concretizado. Vocês são demais!

Aos coorientadores Prof. Jorge Dergam e Prof. Oswaldo Pinto Oliveira Filho, pelo profissionalismo, incentivo, amizade e colaboração na execução deste estudo.

À Prof.^a Mariela Freitas e sua orientada Jerusa Oliveira pelo auxílio e disponibilização de equipamentos e laboratórios para análises de enzimas de estresse oxidativo.

Aos Prof. Juraci Alves, Prof.^a Ita de Oliveira e Prof.^a Mariana Neves por compartilhar conhecimentos, incentivo, conselhos e acima de tudo pela amizade.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo aprendizado adquirido ao longo do curso.

Ao Prof. Oswaldo Pinto Oliveira Filho pela contribuição e por conceder gentilmente os animais utilizados neste experimento.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Isabel, Clóvis, Adilson e Mariana pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Laboratórios Espectrofotometria de absorção atômica, Aplicação de Radioisótopos, Ecofisiologia, Biologia Estrutural, Sistemática Molecular e Ranário onde foram realizadas as atividades deste experimento, por cederem espaço e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao laboratorista Carlinhos, do laboratório de espectrofotometria de absorção atômica, do Departamento de Solos pelas análises realizadas.

Aos professores Gustavo Martins e Jorge Dergam, que gentilmente cederam o espaço e equipamentos necessários para a obtenção de imagens deste estudo.

Ao Sr. Carlos, técnico do laboratório de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral, pela ajuda durante o processo de toxicologia.

Às professoras Fabiana Cristina Silveira Alves Melo, Sirlene Souza Rodrigues Sartori e Ita de Oliveira e Silva, e o professor Sérgio Luís Pinto da Matta que gentilmente aceitaram participar da minha banca de defesa e pelas sugestões ofertadas com o intuito de engrandecer o estudo.

Aos funcionários de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural e do Departamento de Biologia Geral, especialmente à Elizabeth (Beth), pelo atendimento atencioso, pela competência, carinho e amizade.

Aos companheiros de laboratório: Marli, Fabíola, Juliana Silveira, Daiane, Diane, Bruna Fontana, Alex, Matheus, Danielle, Marta, Alex, Ana Paula, Rômulo, Arlete, Reggiani, Graziela, Tatiana, Susana, Camila, Viviane, Ana Carolina, Claudinha, Marcinha, Edson, Michele, Maytê, Glenda, Ana Cláudia, Helen, Kenner, Jefferson, Silvino, Érica, Thamires, Pollyanna, Ítalo, pelos momentos de cooperação e descontração. Todos os momentos com vocês foram de grande aprendizado!

À FAPEMIG e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela participação na aquisição de materiais usados na pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro imprescindível ao longo desses anos em Viçosa - MG.

Aos peixinhos utilizados neste estudo.

Aos amigos Mara Campos e Érick Baraky por pacientemente editarem minhas fotos com carinho.

Aos melhores amigos do mundo: Ana Paula Matta, André Guimarães, Angélica Andrade, Antônio Celso (Junim), Barbara Braga, Bruna Fontana, Cyntia Guimarães, Cristiana Machado, Eduardo Damasceno, Fahyme Costa, Gustavo Hilário, Helena Fantinati, Hugo Maia, Jamile Ladeira, Janaína Stela, Janete Moreira, Jerusa Oliveira, Jorge Soares, Juliana Freitas, Juliana Silveira, Kyvia Lugate, Leandro Santana, Liliane Marques, Lorena Junqueira, Luciane Silva, Mara Campos, Marcelle Souza, Maria Antonieta Parentoni, Mariela Santa Bárbara, Marina Guimarães, Mariana Moraes, Marli Cupertino, Michele Santos, Nayla Deniculi, Paula Lucardie (Pirua), Paulo Cirino, Pedro Henrique (Pedrão), Pollyanna Ferreira, Priscila Gomes, Rayanna Mota, Rose Lucardie (Dinda), Rodrigo Lima, Sávia Souza, Sérgio Luís, Suzanne Guimarães, Thaís Soares, Thiago Lemos (Jaba), Walter (Junim), pelas gargalhadas, companhias, amizade, festas, danças, conselhos, desabafos, confidências, torcida, orações, apoio. Por compreender a minha ausência em muitos momentos!

À minha dinda amada Rose Lucardie pelo amor, risadas, amizade e torcida desde sempre.....

Aos amigos Edson e Ivone pela amizade, incentivo e carinho no final dessa caminhada.

Ao meu filho de 4 patas, Jhonny, pela companhia madrugada a fora, pela alegria com que me recebe quando chego em casa, fidelidade e demonstrações de carinho.

Aos meus anjos: Vovô Orlando, Vovó Inês, Vovô Chico, primo Anderson (Tete), Ramon Braga e Bisa Maria pela luz e proteção. Saudade eterna!

Aos amigos Bôleros pelos momentos de diversão e apoio.

“... Existem pessoas que tornam nossa caminhada mais significativa...”

Pela companhia...

Pelo apoio...

Pelo carinho...

E porque nos torna melhores!”

BIOGRAFIA

Suellen Silva Condessa, filha de Washington Araújo Condessa e Zilda Parreiras Silva Condessa, nasceu na cidade de Timóteo, Vale do Aço, Minas Gerais, em 21 de setembro de 1984.

Em 2002 iniciou o Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia da Conservação pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – UNILESTEMG, na cidade de Ipatinga, Região do Vale do Aço, Estado de Minas Gerais, graduando-se como Bacharel em dezembro de 2006.

Em março de 2007 iniciou disciplinas como estudante não-vinculado, no Programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em outubro de 2009 com o título “Toxicidade subcrônica em lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao zinco”.

Em março de 2010 iniciou o curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em maio de 2014.

SUMÁRIO

Sumário.....	x
Lista de tabelas.....	xv
Lista de figuras.....	xvii
Resumo.....	xxvii
Abstract.....	xxix
1. Introdução.....	01
1.1. Metais pesados e a poluição ambiental.....	01
1.2. Aspectos gerais e toxicologia do cromo.....	01
1.3. Bioindicadores e Biomarcadores.....	03
1.3.1. <i>Astyanax</i> aff. <i>Bimaculatus</i> como bioindicador.....	03
1.3.2. Biomarcadores histopatológicos.....	05
1.3.2.1. Brânquias dos Teleósteos.....	05
1.3.2.2. Fígado dos Teleósteos.....	06
1.3.2.3. Espermatogênese e testículos dos Teleósteos.....	07
1.3.3. Estresse oxidativo como biomarcador.....	08
1.3.3.1. Peroxidação lipídica.....	08
1.3.3.2. Proteínas carboniladas.....	09
1.3.4. Sistema de defesa antioxidante como biomarcador.....	09
1.3.4.1. Sistema enzimático antioxidante.....	10
1.3.4.1.1. Superóxido dismutase (SOD).....	10
1.3.4.1.2. Catalase (CAT).....	10
1.3.4.1.3. Glutathione S-transferase (GST).....	10
1.3.4.2. Sistema não-enzimático antioxidante.....	11

1.3.4.2.1. Ácido ascórbico.....	11
1.4. Processo de bioSORÇÃO e o <i>Cocos nucifera</i> L.	13
1.5. Justificativa.....	14
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivos específicos.....	16
3. Materiais e métodos.....	18
3.1. Mortalidade e comportamento animal.....	18
3.2. Grupos experimentais.....	19
3.3. Períodos de exposição.....	19
3.4. Determinação da concentração de Cr nos tecidos.....	20
3.5. Análises histológicas das brânquias, fígado e testículos.....	20
3.6. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos.....	21
3.6.1. Definição das alterações.....	21
3.6.1.1. Alterações leves (estágio I).....	21
3.6.1.2. Alterações moderadas (estágio II).....	21
3.6.1.3. Alterações severas (estágio III).....	21
3.6.2. Cálculo do IAH.....	22
3.6.3. Cálculo do VMA.....	22
3.7. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos.....	22
3.7.1. Análises morfométricas das brânquias.....	22
3.7.2. Análises morfométricas do fígado.....	22
3.7.3. Análises morfométricas dos testículos.....	22
3.8. Análises das enzimas antioxidantes	23
3.8.1. Superóxido dismutase.....	23
3.8.2. Catalase.....	23
3.8.3. Glutathione S-transferase.....	23

3.9. Determinação dos produtos do estresse oxidativo.....	24
3.9.1. Proteínas carboniladas.....	24
3.10. BioSORÇÃO e <i>Cocos nucifera L.</i>	24
3.11 Análises estatísticas.....	25
5. Resultados.....	26
5.1. Mortalidade e comportamento animal.....	26
5.2. Determinação da concentração de Cr nos tecidos.....	26
5.3. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos.....	28
5.3.1. Histopatologia das brânquias.....	28
5.3.1.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	28
5.3.1.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	32
5.3.2. Histopatologia do fígado.....	36
5.3.2.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	36
5.3.2.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	38
5.3.3. Histopatologia dos testículos.....	40
5.3.3.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	40
5.3.3.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	42
5.4. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos.....	44
5.4.1. Análises morfométricas das brânquias.....	44
5.4.1.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	44

5.4.1.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	45
5.4.2. Análises morfométricas do fígado.....	46
5.4.2.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	46
5.4.2.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	48
5.4.3. Análises morfométricas dos testículos.....	49
5.4.3.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	49
5.4.3.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	49
5.5. Análises das enzimas antioxidantes.....	50
5.5.1. Estresse oxidativo nas brônquias.....	50
5.5.1.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	50
5.5.1.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	51
5.5.2. Estresse oxidativo no fígado.....	52
5.5.2.1. Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	52
5.5.2.2. Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	53
5.5.3. Estresse oxidativo no músculo.....	54
5.5.3.1. Experimento 1: Tecido muscular dos animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias.....	54
5.5.3.2. Experimento 2: Tecido muscular de animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias.....	55

5.6. Bioissorção e <i>Cocos nucifera</i> L.....	56
6.	57
Discussão.....	
6.1. Mortalidade e comportamento animal.....	57
6.2. Determinação da concentração de Cr (VI) nos tecidos.....	57
6.3. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos.....	58
6.3.1. Análises histopatológicas das brânquias.....	58
6.3.2. Análises histopatológicas do fígado.....	63
6.3.3. Análises histopatológicas dos testículos.....	65
6.4. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos.....	68
6.4.1. Análises morfométricas das brânquias.....	68
6.4.2. Análises morfométricas do fígado.....	69
6.4.3. Análises morfométricas dos testículos.....	71
6.5. Análises das enzimas antioxidantes.....	73
6.5.1. Estresse oxidativo nas brânquias.....	73
6.5.2. Estresse oxidativo no fígado.....	76
6.5.3. Estresse oxidativo no músculo.....	79
6.6. Bioissorção e <i>Cocos nucifera</i> L.	80
7. Conclusão.....	81
8. Tabelas.....	82
9. Figuras.....	91
10. Referências bibliográficas.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação da severidade das lesões por categoria de índice de alteração histopatológica (IAH), segundo Polëksic e Mitrovic-Tutundžic (1994).....	82
Tabela 2 Critérios para pontuação das lesões em função da ocorrência das alterações nas brânquias, fígado e testículos modificado de Schwaiger et al. (1997)..	82
Tabela 3: Porcentagem da mortalidade de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.....	83
Tabela 4: Acumulação de Cr nos tecidos de machos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> submetidos a diferentes concentrações deste metal na água durante 15 e 45 dias.....	84
Tabela 5: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.....	85
Tabela 6: Classificação das alterações histopatológicas das brânquias de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.....	86
Tabela7: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas do fígado detectadas em machos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.....	87
Tabela 8 Classificação das alterações histopatológicas do fígado de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.....	88
Tabela 9: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas dos testículos detectadas em machos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.....	89
Tabela 10: Classificação das alterações histopatológicas dos testículos de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.....	90

Tabela 11: Constituição do tecido branquial e quantificação de células em <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.....	136
Tabela 12: Constituição do tecido hepático e quantificação de células em <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.....	137
Tabela 13: Constituição do tecido testicular e quantificação de células em <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.....	138

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Rota de biossíntese do ácido ascórbico (Nelson e Cox, 2000)..... 12
- Figura 2:** Organização estrutural dos filamentos branquiais de *Astyanax aff. bimaculatus* do Grupo Controle: seio venoso central (SVC), epitélio filamental (EF), célula pilar (CP), célula de cloro (CC), célula mucosa (CM), lamela primária (LP), lamela secundária (LS). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm..... 91
- Figura 3A:** Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L⁻¹ de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (1VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (A) aneurisma; (ND) necrose e degenerações celulares; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm..... 93
- Figura 3B:** Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L⁻¹ de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (1VitC⁺): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental; (DE) descamação do epitélio; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DCV) dilatação dos canais vasculares. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm..... 93
- Figura 3C:** Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L⁻¹ de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (10VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (A) aneurisma; (ND) necrose e degenerações celulares; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm..... 95
- Figura 3D:** Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L⁻¹ de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (10VitC⁺): (VD) vacuolização degenerativas; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (REIS)

redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm	95
Figura 3E: Organização estrutural das brânquias de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (20VitC^-): (DLP) deformação das lamelas primárias; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm	97
Figura 3F: Organização estrutural das brânquias de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (20VitC^+): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (ND) necrose e degenerações celulares; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm	97
Figura 3G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) das brânquias de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias.....	98
Figura 4A: Organização estrutural das brânquias de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (1VitC^-): (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamentar; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm	100
Figura 4B: Organização estrutural das brânquias de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (1VitC^+): (AEI) aumento do espaço interlamelar secundário; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (HTC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro; (DLP) deformação da lamela primária). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm	100

Figura 4C: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (10VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (VC) vacuolização degenerativa; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DLP) deformação da lamela primária; (REIS) redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 102

Figura 4D: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (10VitC⁺): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental; (HC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 102

Figura 4E: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (20VitC⁻): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (DCV) dilatação dos canais venosos; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamental; (HC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro; (REIS) redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 104

Figura 4F: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (20VitC⁺): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (DLP) deformação da lamela primária; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamental; (AEI) aumento do espaço interlamelar secundário; (A) aneurisma; Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 104

Figura 4G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45

dias.....	105
Figura 5: Organização histológica do tecido hepático de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> do Grupo Controle. Hepatócito (HP), capilar sinusoide (CS), infiltrado leucocitário (IL), veia central (VC). Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 µm.....	106
Figura 6A: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 1mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC ⁻): (VH) vacuolização hepatocelular; (ND) necrose e degenerações de hepatócitos. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 µm.....	108
Figura 6B: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 1mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC ⁺): (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (VH) vacuolização hepatocelular. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 µm.....	108
Figura 6C: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 10mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC ⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (HH) hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 µm.....	110
Figura 6D: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 10mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC ⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 µm.....	110
Figura 6E: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> expostos a 20mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC ⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e	

Eosina. Barra: 20 μm	112
Figura 6F: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC ⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm	112
Figura 6G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias.....	113
Figura 7A: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC ⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (IL) infiltrados leucocitários. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm	114
Figura 7B: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC ⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (IL) infiltrados leucocitários. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm	115
Figura 7C: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC ⁻): (VH) vacuolização hepatocelular; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm	117
Figura 7D: Organização histológica do fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC ⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (NP) núcleo picnótico; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina.....	117

- Figura 7E:** Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (VH) vacuolização hepatocelular; (IL) infiltrado leucocitário. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm 119
- Figura 7F:** Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (IL) infiltrado leucocitário; (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm 119
- Figura 7G:** Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45 dias..... 120
- Figura 8:** Organização histológica do tecido testicular de *Astyanax aff. bimaculatus* do Grupo Controle. Cistos (C), lúmen testicular contendo espermatozoides e fluido testicular (SPTZ), intertúbulo (IT), célula de Sertoli (CS), espermatogônias (ES). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 121
- Figura 9A:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC⁻): (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degenerações; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 123
- Figura 9B:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (V) vacúolos; (ND) necroses e degenerações. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 123

- Figura 9C:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC⁻): (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degenerações; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 125
- Figura 9D:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (ND) necroses e degenerações; (DI) dilatação intertubular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 125
- Figura 9E:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 127
- Figura 9F:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 127
- Figura 9G:** Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias..... 128
- Figura 10A:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm 130
- Figura 10B:** Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com

suplementação da vitamina C (1VitC ⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm.....	130
Figura 10C: Organização histológica dos testículos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 10mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC ⁻): (ND) necrose e degenerações; (AN) agrupamento nuclear; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm.....	132
Figura 10D: Organização histológica dos testículos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 10mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC ⁺): (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degenerações. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm.....	132
Figura 10E: Organização histológica dos testículos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 20mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC ⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm.....	134
Figura 10F: Organização histológica dos testículos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a 20mg.L ⁻¹ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC ⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 µm.....	134
Figura 10G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) dos testículos de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45 dias.....	135
Figura 11: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no tecido branquial de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. (A) Atividade da enzima SOD no tecido branquial de <i>A. aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas	

suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias..... 139

Figura 12: Atividades da enzimas antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido branquial de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias..... 140

Figura 13: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e proteínas carboniladas no tecido hepático de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima SOD no tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias..... 141

Figura 14: Atividade da enzima antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido hepático de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias..... 142

Figura 15: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no tecido muscular de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima SOD no tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. 143

Figura 16: Atividade da enzima antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido muscular de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias..... 144

Figura 17: Percentual de remoção de íons de Cr (VI) pelo pó da casca de coco, $C_o = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; 10 mg.L^{-1} e 20 mg.L^{-1} , $\omega = 175 \text{ rpm}$, $C_{\text{biomassa}} = 5 \text{ g L}^{-1}$ 145

RESUMO

CONDESSA, Suellen Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2014. **Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação da vitamina C em *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) machos adultos e potencial biossorbitivo da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.).** Orientador: Juliana Silva Rocha.

Os metais pesados têm despertado grande interesse ambiental, por não serem biodegradáveis e pelo fato de, na maioria das vezes, o meio aquático tornar-se o destino final para esses poluentes metálicos. Uma vez neste ambiente, eles podem se acumular na biota aquática em níveis significativamente elevados, e porque muitas espécies aquáticas são utilizadas para consumo humano, elas podem tornar-se uma via de contaminação indireta para o ser humano. Além disso, por serem potenciais bioacumuladores de metais, espécies aquáticas podem servir de bioindicadores do grau de contaminação ambiental. Diante deste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da exposição ao cromo hexavalente [Cr (VI)] em diferentes compartimentos orgânicos de lambaris adultos, através de parâmetros histopatológicos, enzimáticos e morfométricos, também o poder protetor da vitamina C em animais expostos ao metal, e o potencial do pó da casca de coco verde no processo de biossorção do Cr. Para tal, foram utilizados 140 machos de *Astyanax aff. bimaculatus* em idade adulta, com média de peso corporal e comprimento total de $4,49 \pm 0,63$ g e $6,00 \pm 0,47$ cm, respectivamente, procedentes da Estação de Piscicultura da UFV, localizada na cidade de Viçosa-MG. Os animais foram mantidos em sete aquários de vidro, com água livre de cloro, mantendo-se 20 peixes por aquário, durante 15 dias (Experimento 1) e 45 (Experimento 2) dias. O tratamento consistiu em adicionar diferentes concentrações (1,0, 10 e 20 mg.L^{-1}) de Cr (VI) na água. Sendo que sessenta peixes receberam Cr (VI) mais uma ração suplementada com vitamina C (Vit C⁺: 30 mg.Kg^{-1}) e outros sessenta peixes foram expostos as concentrações do metal mas receberam ração comercial sem adição da vitamina (Vit C⁻). Vinte peixes foram utilizados como Grupo Controle, portanto não foram expostos ao metal e também não receberam ração suplementada de vitamina C. Após os períodos experimentais, 10 animais de cada grupo foram pesados, mensurados e eutanasiados. Fragmentos das brânquias, fígado, testículos, vértebras, intestino, cabeça e músculo foram coletados e utilizados para avaliação da concentração do metal através de

espectrofotometria de absorção atômica. Fragmentos de brânquias, fígado e testículos foram fixados, incluídos em resina, cortados, devidamente corados e utilizados nas análises histopatológicas semiquantitativas das patologias encontradas, através do cálculo do Valor Médio da Alteração (VMA) e do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), e também morfométricas quantitativas, com auxílio do programa para análise de imagem Image-Pro Plus. Para as análises enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e proteínas carboniladas, foram utilizadas amostras dos tecidos branquial, hepático e muscular. O potencial do pó da casca de coco verde no processo de bioacumulação do Cr foi testado utilizando-se soluções com as diferentes concentrações do metal supracitadas. Houve mortalidade dos peixes nos grupos 20VitC⁻ e 20VitC⁺ a partir do 22^o dia de tratamento. Foi constatado o acúmulo de Cr em todos os tecidos avaliados dos grupos VitC⁻ e VitC⁺, dos experimentos 1 e 2. Foram quantificadas diversas patologias presentes em diferentes graus de severidade nas brânquias, fígado e testículos dos animais expostos ao metal. Os cálculos dos VMA revelaram que os tecidos branquial, hepático e testicular dos animais dos grupos VitC⁻ e VitC⁺ nos experimentos 1 e 2 apresentaram danos discretos, moderados, intensos e severos. Os valores médios do IAH dos grupos VitC⁻ e VitC⁺ dos experimentos 1 e 2 indicaram que o tecido branquial apresentou alterações leves; o tecido hepático, alterações leves; e o tecido testicular possuía alterações leves e moderadas. Foram observadas alterações na morfometria das brânquias, fígado e testículos. Foi constatado, também, que a exposição a diferentes dosagens de Cr (VI) pode alterar a formação de radicais livres nos peixes. Em relação à possível ação protetora da vitamina C, ela foi observada em diferentes graus nos diferentes tecidos dos lambaris, sendo observada uma interação desta vitamina com as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), na tentativa de reduzir ou neutralizar o estresse oxidativo induzido pelo Cr (VI). Quanto à bioacumulação, a casca de coco demonstrou ser um promissor material bioacumulante. Pode-se concluir que a exposição ao Cr (VI), além de levar à bioacumulação em diferentes órgãos dos animais estudados, causou alterações patológicas e morfométricas nas brânquias, fígado e testículos, além de alterações enzimáticas e induziu estresse oxidativo nos tecidos branquial, hepático e muscular de indivíduos de *Astyanax aff. bimaculatus*.

ABSTRACT

CONDESSA, Suellen Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2014. **Oxidative stress caused by hexavalent chromium and action of vitamin C in *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) adult males and bioassortivo potential of coconut husk (*Cocos nucifera* L.).** Adviser: Juliana Silva Rocha.

Heavy metals have attracted great environmental interest, because they are not biodegradable and because, in most cases, the aquatic environment becoming the final destination for these metal pollutants. Once this environment, they can accumulate in the aquatic biota at significantly higher levels and because many aquatic species are used for human consumption, they can become a means of cross-contamination to humans. In addition, metals are potential bioaccumulators, aquatic species can serve as bioindicators in the degree of environmental contamination. Given this context, the present study evaluated the effects of exposure to hexavalent chromium [Cr (VI)] in different compartments organic adult minnows through histopathological, enzymatic and morphometric parameters, also the protective action of vitamin C in animals exposed to metal and the potential of dust from coconut husk in the Cr biosorption process. To this end, 140 *Astyanax aff. bimaculatus* males were used in adult age, mean body weight and total length of 4.49 ± 0.63 g and 6.00 ± 0.47 cm, respectively, coming from the UFV Fish Culture Station, located in Viçosa - MG . The animals were kept in glass aquaria seven with chlorine free water, remaining 20 fish per tank for 15 days (Experiment 1) and 45 days (Experiment 2). The treatment consisted of adding various concentrations (1.0, 10 and 20 mg.L⁻¹) Cr (VI) in water. Since sixty fish received Cr (VI) plus commercial diet supplemented with vitamin C (Vit C⁺: 30 mg.Kg⁻¹) and another sixty fish were exposed to concentrations of metal but received commercial diet without added vitamin (Vit C⁻). Twenty fish were used as control group, so they were not exposed to the metal and also did not receive dietary supplementation of vitamin C. After the experimental period, 10 animals from each group were weighed, measured and euthanized. Fragments of gills, liver, testes, vertebrae, intestines, head and muscle were collected and used to evaluate the concentration of the metal by atomic absorption spectrophotometry. Fragments of gills, liver and testes were fixed, embedded in resin, section, properly stained and used in semiquantitative histological

analyses of the pathologies found by calculating the Average Value of Change (AVC) and Histopathological Change Index (HCI) and quantitative morphometric also, with the aid of image analysis software image - Pro Plus. For enzyme analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S- transferase (GST) and protein carbonyls, samples of the gill, liver and muscle tissues were used. The potential of the powder of coconut husk in the biosorption process of chromium was tested using solutions with different concentrations abovementioned of the metal. Fish mortality was observed in groups 20VitC⁻ and 20VitC⁺ from day 22 of treatment. The accumulation of Cr in all tissues evaluated of VitC⁻ and VITC⁺ groups of experiments 1 and 2. Was found several pathologies were quantified in different degrees of severity in the gills, liver and testes of animals exposed to the metal. Calculations of AVC revealed that the gill, liver and testis tissues of animals groups VitC⁻ and VITC⁺ in experiments 1 and 2 showed mild, moderate, intense and severe damage. The mean values of HCI of groups VitC⁻ and VITC⁺ of experiments 1 and 2 indicated that the gill tissue showed slight changes; liver tissue, slight modifications and testicular tissue had slight to moderate changes. Morphometric changes in the gills, liver and testes were observed. It was also noted that exposure to different doses of Cr (VI) can change the free radical formation in fish. Regarding the possible protective action of vitamin C, it was observed to varying degrees in different tissues of minnows, an interaction of this vitamin with antioxidant enzymes (SOD, CAT and GST) was observed in an attempt to reduce or neutralize the oxidative stress induced for Cr (VI). As for biosorption, coconut shells proved to be a promising biosorbent material. It can be concluded that exposure to Cr (VI) and lead to bioaccumulation in different organs of the animals studied, caused pathological and morphometric changes in the gills, liver and testes, and enzymatic changes induced oxidative stress in gill, liver and muscle tissues of individuals of *Astyanax* aff. *bimaculatus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metais pesados e a poluição ambiental

Os metais pesados são definidos como elementos químicos que apresentam densidade maior que 5 g.cm^{-3} (Lars, 2003). Os metais pesados têm despertado grande interesse ambiental, principalmente pelo fato de não apresentarem caráter de biodegradabilidade. Isto faz com que permaneçam em ciclos biogeoquímicos globais, sendo o da água natural o seu principal meio de condução, expondo a biota aquática e levando a bioacumulação na mesma em níveis muitas vezes significativamente elevados. Desse modo, espécies aquáticas, algumas delas comumente utilizadas para consumo humano, são potenciais bioacumuladores de metais (Silva e Pedrozo, 2001). Nas últimas décadas vem crescendo a utilização de organismos aquáticos como bioindicadores e biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

1.2. Aspectos gerais e toxicologia do cromo

O cromo é um elemento químico de símbolo Cr, número atômico 24, com massa atômica 52, pertence ao grupo seis ou 6B da classificação periódica dos elementos químicos, sendo o sétimo metal pesado mais abundante na Terra como um todo (Silva e Pedrozo, 2001). É encontrado naturalmente em rochas, animais, plantas, solo, poeiras e névoas vulcânicas (WHO, 1988; ATSDR, 2000). Esse metal faz parte da composição de diversos óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos, sais básicos, e recobre peças metálicas e plásticas. O minério cromita é o mais abundante composto de Cr encontrado na natureza, de fórmula $\text{FeO.Cr}_2\text{O}_3$ ou $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$, contendo de 40 a 50% de Cr (HSDB, 2000).

Esse elemento químico é encontrado principalmente em dois estados de oxidação: o hexavalente [Cr (VI)] e o trivalente [Cr (III)]. O Cr (VI) é altamente tóxico (Palmer e Puls, 1994; ATSDR, 2012), mutagênico (Bianchi, et al., 1984), teratogênico (Abbasi e Soni, 1984), cancerígeno (Sedman et al., 2006; Hara et al., 2010). Origina-se, principalmente, de atividades antropogênicas (indústrias têxteis, refinarias de petróleo, curtumes e empresas de galvanização), sendo transferido para o ambiente por meio de emissões pelo ar e/ou pela água, principalmente devido ao seu armazenamento incorreto e uso impróprio (Lushchak, 2011; ATSDR, 2012). O Cr (VI) é classificado pela The Comprehensive Environmental Response,

Compensation, and Liability – CERCLA (1997) em 16^o lugar na lista das substâncias perigosas (Silva e Pedrozo, 2001). Em contraste, o Cr (III) tem um potencial de toxicidade relativamente baixo e ocorre naturalmente em níveis diminutos na natureza. Outro aspecto interessante é que o Cr (III) é considerado um nutriente essencial para os humanos (Sedman et al., 2006; ATSDR, 2012), por ter papel importante no metabolismo da glicose, inclusive servindo como cofator para a ação da insulina (Vincent, 1999).

Pela legislação brasileira, a Resolução 397/2008 do CONAMA (Brasil, 2008) estabelece os limites e padrões de lançamento de efluentes em relação ao Cr (III) de 1,0 mg.L⁻¹ e Cr (VI) de 0,1 mg.L⁻¹. Enquanto isso, a Resolução 357/2005 do CONAMA (Brasil, 2005) estabelece o limite máximo de 0,05 mg.L⁻¹ para o Cr total em água própria para criação de animais. No entanto, as agências U.S. EPA (Pawlisz et al., 1997), ATSDR (Silva e Pedrozo, 2001) e WHO (Velma et al., 2009) determinam como limite aceitável 0,05 mg.L⁻¹ para o Cr (VI) para a água tanto de beber como para criação de animais, e também como sendo um critério geral de qualidade ambiental. A Assembleia Legislativa do estado de São Paulo aprovou em 2006 o projeto de lei N^o 695, onde decreta: “Artigo 1^o – Ficam proibidos o fabrico, comércio, armazenagem e utilização de tintas, pigmentos, vernizes, corantes e outros produtos similares, que contenham metais pesados, tais como chumbo e cromo.” (Diário Oficial do Estado de São Paulo, 2006).

É interessante notar que, em baixas concentrações, metais como ferro (Fe), cobre (Cu), cromo trivalente [Cr (III)], magnésio (Mg), manganês (Mn) e zinco (Zn) são considerados elementos essenciais para os organismos vivos, podendo até causar doenças em caso de quantidades reduzidas destes metais no organismo. Porém, a atividade de uma substância tóxica depende sempre de sua concentração no organismo, já que a maioria dos metais pesados, se ingeridos em concentrações elevadas, são venenos acumulativos para o organismo (Guilherme et al., 2005). Uma vez absorvidos, os metais pesados geralmente se ligam a proteínas carreadoras e são então transportados através da corrente sanguínea até os tecidos, onde podem ser estocados ou biotransformados (Jobling, 1995). A toxicidade celular causada por estes metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com grupos funcionais de enzimas, o que afeta a atuação destas enzimas e o adequado funcionamento do organismo, e a combinação dos metais com

as membranas celulares, o que perturba ou impede completamente o transporte de substâncias essenciais através das mesmas (Goldhaber, 2003).

1.3. Bioindicadores e Biomarcadores

O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem crescendo nas últimas décadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005). Bioindicadores são definidos como espécies da fauna e flora capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis da organização biológica (Adams, 2002). Biomarcadores são indicadores biológicos que demonstram os efeitos resultantes da exposição a um estressor, que pode ser interpretado como evento adaptativo não patogênico ou como séria alteração de um evento funcional, que depende da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor (Decaprio, 1997). Os biomarcadores constituem uma ferramenta eficiente nos estudos de avaliação de risco e impacto ambiental, principalmente para monitorar a saúde do ecossistema aquático, pois detectam de forma precoce os efeitos reais que estão ocorrendo nos seres vivos em situações de exposição a ambientes poluídos (Freire et al., 2008). Os efeitos dos contaminantes em peixes, por exemplo, podem se manifestar em vários níveis da sua organização biológica, incluindo alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, patologias em geral, respostas farmacocinéticas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Rand e Petrocelli, 1985; Adams, 1990; Condessa, 2009).

1.3.1. *Astyanax* aff. *bimaculatus* como bioindicador

O lambari *Astyanax* aff. *bimaculatus* é um peixe teleósteo pertencente à família Characidae, a qual engloba a maior parte dos peixes de água doce do Brasil. As espécies do gênero *Astyanax* são consideradas como *Incertae Sedis* dentro dos Characidae (Lima et al., 2003), porque diversas de suas populações apresentam, aparentemente, pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental, sugerindo ser este um grupo em especiação. Dentro do gênero *Astyanax*, os dois complexos de espécies com maior distribuição são os lambaris-de-rabo-vermelho – *A. fasciatus* – e os lambaris-do-rabo-amarelo – *A. aff. bimaculatus* (Araújo e Simoni, 1997), conhecidos também por tambiú, piabas no Nordeste e matupiris no Norte do Brasil. Os dois complexos estão distribuídos desde o Norte e Nordeste brasileiro até

a bacia do Prata (Agostinho et al., 1982; Barbieri et al., 1982). São apreciados na pesca esportiva e têm importante função como larvófagos, alimentando-se, por exemplo, de larvas de pernilongos. Na cadeia alimentar dos sistemas ecológicos em que ocorrem, são importantes na base trófica para as espécies carnívoras (Morais et al., 2007), sendo assim considerados como elementos importantes para a manutenção do equilíbrio ecológico. Adicionalmente, esse complexo ao qual pertence o *A. aff. bimaculatus* abriga organismos comumente usados como modelos em estudos de histopatologia (Akaishi et al., 2004; Condessa, 2009; Flores-Lopes e Thomaz, 2011; Gomes et al., 2012; Santos et al., 2012), citogenética (Almeida-Toledo et al., 2002; Hashimoto et al., 2011; Kavalco et al., 2011) e reprodução (Mazzoni et al., 2005; Sato et al., 2006; Veloso-Júnior et al., 2007).

O lambari-do-rabo-amarelo é um peixe de pequeno porte, atingindo cerca de 20 cm de comprimento e peso de até 40 g, com o corpo alto, o dorso castanho-escuro e uma mancha umeral negra ovalada de limites bem distintos. Apresenta uma faixa lateral prateada ou escura, ao logo do flanco, até a mancha no fim do pedúnculo caudal. As nadadeiras ventrais e a caudal são amarelas (Lima et al., 2003; Paiva et al., 2006), os machos possuem espículas, próximo ao pedúnculo caudal, que os diferem sexualmente das fêmeas. Muito ativos, apresentam o mesmo ciclo reprodutivo dos peixes de piracema, realizando curtas migrações ascendentes na época de cheias, o que lhes proporciona o estímulo necessário para a reprodução (Lima et al., 2003; Gurgel, 2004; Paiva et al., 2006). Dependendo das condições ambientais, podem apresentar desova parcelada ou total (Ihering e Azevedo, 1934; Nomura, 1975; Gennari Filho e Braga, 1996; Garutti, 2003). As estimativas para o tamanho de maturação sexual da espécie variam de 7,8 a 10,4 cm de comprimento total (Nomura, 1975; Agostinho et al., 1984; Santos, et al., 1991). A idade da primeira maturação gonadal em cativeiro ocorre aos quatro meses (Silva et al., 1996). Espécimes coletadas no rio Mogiguaçu (SP) definiram a espécie *A. aff. bimaculatus* como onívora, com predominância de consumo de restos de vegetais superiores (Nomura, 1975). Insetos (Silva, 1998) e microcrustáceos constituem-se também um recurso relativamente expressivo na alimentação destes peixes (Gaspar da Luz, 1996).

1.3.2. Biomarcadores histopatológicos

Características histopatológicas específicas de cada organismo decorrem de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas que levam ao surgimento de lesões nas células, nos tecidos e até órgãos inteiros (Hinton e Laurén, 1990; Hinton et al., 1992). Biomarcadores histopatológicos são utilizados em estudos de campo para avaliar o efeito tóxico de poluentes no ambiente aquático e permitem diferenciar lesões nos órgãos, induzidas por doenças e por outros fatores do ambiente daquelas provocadas pela exposição aos poluentes (Schwaiger et al., 1997).

1.3.2.1. Brânquias dos Teleósteos

As brânquias dos teleósteos são constituídas por quatro arcos branquiais que se localizam de cada lado da cavidade bucal (Flores-Lopes e Thomaz, 2011; Thophon et al., 2003). A partir de cada arco branquial estende-se uma estrutura cartilaginosa, a qual possui uma fileira dupla de filamentos branquiais achatados dorso-ventralmente (Mallatt, 1985; Takashima e Hibiya, 1995; Thophon et al., 2003; Figueiredo-Fernandes et al., 2007). Estes filamentos branquiais são chamados de lamelas primárias e são revestidos por um epitélio estratificado, denominado de epitélio filamentar, constituído por diversos tipos de células, entre os quais se distinguem células pavimentosas e células mucosas (Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Flores-Lopes e Thomaz, 2011). As lamelas primárias subdividem-se em lamelas secundárias, dispostas perpendicularmente às primeiras. Estas estruturas possuem rica vascularização, são revestidas por epitélio pavimentoso, sendo local de ocorrência de trocas gasosas. O eixo das lamelas secundárias apresenta capilares sanguíneos entremeados por células endoteliais modificadas, as células de pilar, as quais apresentam atividade contrátil e, na base das lamelas, encontramos células claras denominadas células de cloro (Takashima e Hibiya, 1995; Thophon et al., 2003).

O contato direto entre as brânquias e o meio aquático, além da presença de sítios de ligações iônicas, acaba levando a maior interação deste órgão com as substâncias tóxicas encontradas na água (Hollis e Playle, 1997). A fina camada epitelial que recobre as lamelas secundárias representa o local de maior troca gasosa. As células de cloro, responsáveis pelas trocas iônicas, estão concentradas geralmente na lamela primária, mas também são encontradas entre as lamelas secundárias sob condições de baixas concentrações iônicas. Além de transportar sódio, cloro e cálcio,

estas células podem eventualmente acumular metais tóxicos e outras substâncias, o que leva a alterações indicativas de resposta morfológica de proteção do organismo, pois aumenta a barreira água-sangue aos poluentes tóxicos biodisponíveis. Esta barreira pode fazer com que os peixes morram asfixiados quando o espaço entre as lamelas secundárias, onde ocorrem trocas gasosas, se torna muito pequeno (Fracácio et al., 2003).

1.3.2.2. Fígado dos Teleósteos

A maioria das espécies de teleósteos possui fígado dividido em três lóbulos (Bertolucci et al., 2008). Porém, alguns peixes podem apresentar particularidades quanto ao arranjo e disposição dos lóbulos, que pode variar de espécie para espécie e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Vicentini et al., 2005). O tecido hepático possui vários capilares sinusoides ramificados originados da veia porta, os quais transportam o sangue que acabou de passar pelo estômago e intestino (Fricke et al., 2012). Colunas de hepatócitos polarizados se dispõem entre os capilares (Kendall e Hawkins, 1975; Bruslè e Anadon, 1996; Bertolucci et al., 2008; Fricke et al., 2012). Os hepatócitos apresentam uma face sinusoidal para absorção e uma face biliar para excreção (Vicentini et al., 2005). Além disso, células pancreáticas podem ser encontradas dispersas no tecido hepático dos teleósteos (Hepatopâncreas). Essas células se diferenciam do tecido hepático por apresentarem um arranjo acinar e por estarem separadas do tecido hepático por uma cápsula conjuntiva (Bruslè e Anadon, 1996).

O fígado é um órgão chave para avaliação da ação dos poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação dos metais pesados e, provavelmente, na excreção destes metais, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes tanto no ambiente quanto em outros órgãos e, como consequência, muitos metais se acumulam no fígado (Heath, 1987). Devido à sua função e à sua vulnerabilidade aos poluentes do ambiente, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e inorgânicos (Hinton et al., 1992). Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores do grau de contaminação aquática (Hinton et al., 1992; Gundersen et al., 2000), pois, na presença de poluentes, o fígado pode desenvolver alterações histológicas que podem

ser usadas para o monitoramento de níveis de contaminação aquáticos e seus efeitos (Gundersen et al., 2000; Amorim et al., 2000; Paris-Palácios et al., 2000; Schwaiger, 2001; Pacheco e Santos, 2002; Thophon et al., 2003; Fanta et al., 2003). Por isso, alguns parâmetros hepáticos, como alterações histológicas e depleção de glicogênio, têm sido utilizados em programas de biomonitoramento (Schwaiger et al., 1997; Johnsen et al., 1998; Pacheco e Santos, 2002; Fanta et al., 2003).

1.3.2.3. Espermatogênese e testículos dos Teleósteos

Em todos os vertebrados, de peixes a mamíferos, os testículos são constituídos por dois compartimentos principais: o tubular, composto pelos túbulos seminíferos, e o intertúbulo (ou intersticial). O compartimento intertubular corresponde ao tecido existente entre os túbulos seminíferos, e contém vasos linfáticos, vasos sanguíneos, macrófagos, mastócitos, fibrócitos/fibroblastos, e as células de Leydig (ou intersticiais), as quais estão envolvidas com a produção de andrógeno (Koulish et al., 2002). O compartimento tubular é composto por lúmen e um epitélio seminífero delimitado por uma membrana basal envolta por células mioides peritubulares. Este epitélio contém dois tipos celulares: as células de Sertoli (ou de sustentação) e as células germinativas, as quais se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento (Schulz e Miura, 2002). Os vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios) apresentam espermatogênese cística (Callard, 1996). Assim, as unidades funcionais do epitélio espermatogênico em peixes são os cistos espermatogênicos, os quais se formam quando uma célula de Sertoli se associa a uma espermatogônia primária. Durante o processo espermatogênico, a maioria das células germinativas dentro de um cisto estão na mesma fase de desenvolvimento (Pudney, 1995).

O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo durante a ontogenia do indivíduo e está sujeito ao efeito de estressores ambientais em todas as fases do ciclo da vida do animal (Hoar e Randall, 1969). A exposição a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida tem como características relacionadas com o aparelho reprodutor: o retardamento de fases de desenvolvimento e da maturação gonadal; a redução no número e viabilidade de gametas; histopatologias de testículo e ovário; e a redução do número e viabilidade de descendentes (Rand e Petrocelli, 1985; Adams, 1990).

1.3.3. Estresse oxidativo como biomarcador

O oxigênio no seu estado molecular (O_2) é essencial para muitos processos metabólicos vitais (Ahmad, 1995). O caráter birradical do O_2 admite reações de oxidação e redução possibilitando, assim, a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Barbosa et al., 2010). A redução tetravalente do oxigênio, catalisada pela enzima citocromo-oxidase, ao final da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, gera moléculas de água. No entanto, a redução monovalente, em consequência de processos metabólicos celulares normais, gera as EROs (Martínez-Álvarez et al., 2005). As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, dentre elas, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Riley e Behrman, 1991). Em concentrações fisiológicas, as EROs têm funções biológicas, porém, quando presentes em quantidades excessivas, podem induzir o estresse oxidativo (Sharma e Agarwal, 1996). Este tipo de estresse se caracteriza pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, alterando assim a homeostase redox e induzindo a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Barbosa et al., 2010).

A resposta oxidativa depende da intensidade do estímulo, resultando em adaptação ou lesão celular. No mecanismo de adaptação, as células, para tolerar o estresse oxidativo, sintetizam moléculas que farão a defesa antioxidante até o restabelecimento do equilíbrio. A lesão ocorre como resultado da alteração transitória ou permanente da homeostase celular após estímulos, químicos ou fisiológicos (Droge, 2002; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

1.3.3.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (POL) é uma das mais importantes causas de lesão e morte celular decorrente do estresse oxidativo. Ela ocorre a partir de reações em cadeia, e é geralmente catalisada por metais de transição. A anormalidade das membranas plasmáticas, como alteração da fluidez, perda da permeabilidade seletiva e ruptura são consequências da POL. Os derivados das reações envolvidas na POL podem se difundir para outros compartimentos celulares, agredir proteínas e o DNA e causar a inibição de algumas enzimas (Hermes-Lima, 2004).

Segundo Hermes-Lima (2004), a POL possui 3 principais fases: **Iniciação:** ocorre pela abstração de um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-

CH₂-) de uma cadeia de ácidos graxos insaturados, formando o radical alquila (L[•]). O radical L[•] se estabiliza por ressonância e origina dieno conjugados. O radical mais importante na fase de iniciação da peroxidação lipídica é o radical hidroxila (OH[•]), mas os radicais peroxinitrito (NO₂[•]), espécies perferril (Fe⁺³-O₂-) e espécies ferril (Fe⁺⁴=O) também estão envolvidos nas reações. Em seguida, o oxigênio molecular é adicionado ao carbono central do radical L[•] e dá origem ao radical peroxila (LOO[•]); **Propagação:** o radical LOO[•] reage (através da abstração de hidrogênio) com outros ácidos graxos insaturados, resultando em hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Metais de transição como o ferro e o cobre também podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila, e hidroxila; **Terminação:** o LOOH irá decompor-se em outras espécies reativas, como o radical alcóxila (LO[•]), aldeídos (malondialdeído), alcanos e alcoóis.

1.3.3.2. Proteínas carboniladas

As proteínas são alvo da oxidação celular nos locais onde sofrem modificações covalentes possuindo poucos mecanismos celulares para reparo ou proteção. Eventos que têm como produtos metabólitos do óxido nítrico, a oxidação de açúcares, a desnaturação e a glicação não enzimática acarretam a oxidação de proteínas (Hermes-Lima, 2004). Esta pode ocorrer por inúmeros mecanismos, e o mais importante deles é a oxidação de proteínas mediada por íons ferro e cobre, a qual induz danos nos receptores de membrana, inibição de enzimas e modificações estruturais nas proteínas (Schacter, 2000; Hermes-Lima, 2004).

As proteínas carboniladas são, portanto, produto da oxidação de proteínas, num processo que pode ser irreversível, sendo considerado o mais importante dos danos causados pelas EROs nas proteínas. O aumento da concentração destas proteínas resulta em diversas doenças, fazendo das proteínas carboniladas um biomarcador de estresse oxidativo (Schacter, 2000; Hermes-Lima, 2004).

1.3.4. Sistema de defesa antioxidante como biomarcador

O sistema de defesa antioxidante, enzimático ou não enzimático, é um processo de sinalização redox (Droge, 2002) que inibe o estresse oxidativo e limita o excesso da síntese de EROs. Dentre as defesas enzimáticas, tem-se a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione S-transferase (GST), a Glutathione Peroxidase (GPx), a Glutathione reduzida (GSH), a Glutathione Redutase (GR) e a

Glicose -6- fosfatase desidrogenase (G6PDH). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, temos o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e a Glutathiona total (GSH-eq). No entanto, a primeira linha de defesa antioxidante ocorre pelo sistema citocromo P450 e inclui as enzimas SOD e CAT. Na segunda fase, as enzimas catalisam a conjugação de xenobióticos para um substrato solúvel endógeno, e inclui as enzimas específicas GPx, a GST, e a GR (Sheehan et al., 2001; Hermes-Lima, 2004).

1.3.4.1. Sistema enzimático antioxidante

1.3.4.1.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa o radical superóxido, através da reação de dismutação, em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é mais reativo e pode ser degradado por outras enzimas como a CAT e a GPx. Existem três tipos de enzimas SOD: a SOD-Cobre/Zinco, encontrada no citoplasma, lisossomas, peroxissomas, núcleos, e no espaço intermembranar mitocondrial; a SOD-Manganês encontrada somente nas mitocôndrias e que tem o papel de controlar o estresse oxidativo e a regulação da concentração de O_2^- nas mitocôndrias; e a SOD-EC (superóxido dismutase extracelular), que é uma glicoproteína presente no espaço extracelular, especialmente nas células dos vasos pulmonares e no sangue. Todas as formas da enzima SOD estão presentes em todos os tecidos, porém em pequenas concentrações no tecido nervoso (Hermes-Lima, 2004; Droge, 2002; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

1.3.4.1.2. Catalase (CAT)

A CAT é uma peroxidase que degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Esta enzima é encontrada no citoplasma, em grande concentração nos peroxissomos de todos os tecidos animais, porém é mais eficiente quando as concentrações intracelulares de H_2O_2 são mais elevadas. O cérebro e coração não possuem peroxissomos e por isso, apresentam baixa concentração de CAT, sendo mais sensíveis a danos oxidativos (Hermes-Lima, 2004; Droge, 2002).

1.3.4.1.3. Glutathiona S-transferase (GST)

A superfamília da enzima GST é a principal enzima de desintoxicação da segunda fase da defesa antioxidante, sendo encontrada principalmente no citoplasma

das células e realiza a desintoxicação celular contra diversos tipos de poluentes ambientais e agentes cancerígenos. Esta desintoxicação ocorre através de conjugados de glutatona com xenobióticos e produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica (hidroperóxidos), tornando os produtos mais solúveis em água (Hermes-Lima, 2004; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

1.3.4.2. Sistema não-enzimático antioxidante

1.3.4.2.1. Ácido ascórbico

Ácido ascórbico e Vitamina C são nomes comuns do ácido 2,3-enediol-*L*-gulônico, sendo um dos nutrientes presentes nas rações de organismos aquáticos, que atua como potencial agente redutor em várias reações metabólicas. Esta vitamina se caracteriza por ser hidrossolúvel e termoinstável (Rotta, 2003). Sua importância para os organismos aquáticos baseia-se nas seguintes formas de utilização: reduzida – *L* ácido ascórbico) – ou oxidada – ácido desidroascórbico, as quais representam a forma ativa de maior retenção no organismo e a menos ativa de simples eliminação, respectivamente (Rotta, 2003).

Os peixes, assim como outros animais, precisam da enzima *L*-gulonolactona oxidase durante a catalisação do último passo da transformação do ácido glicurônico em ácido ascórbico. Esta transformação ocorre através da ativação da *D*-glicose-1-fosfato pelo estímulo provocado pela ligação de um nucleotídeo (uridina-difosfato – UDP), e que é catalisada pela enzima glicose-1-fosfato uridil tranferase. Logo em seguida, a UDP-glicose sofre oxidação no carbono 6 (C-6) para formar o Ácido *D*-glicurônico, o qual é catalisado pela enzima UDP-glicose desidrogenase. Por meio do processo de hidrólise, o ácido *D*-glicurônico forma o *D*-glicuronato, que atua como precursor do ácido ascórbico; o *D*-glicuronato é reduzido a *L*-gulonato, o qual é transformado em *L*-gulonolactona, que então sofre desidrogenação pela flavoproteína *L*-gulonolactona oxidase, finalmente gerando o ácido ascórbico (Figura 1) (Nelson e Cox, 2000).

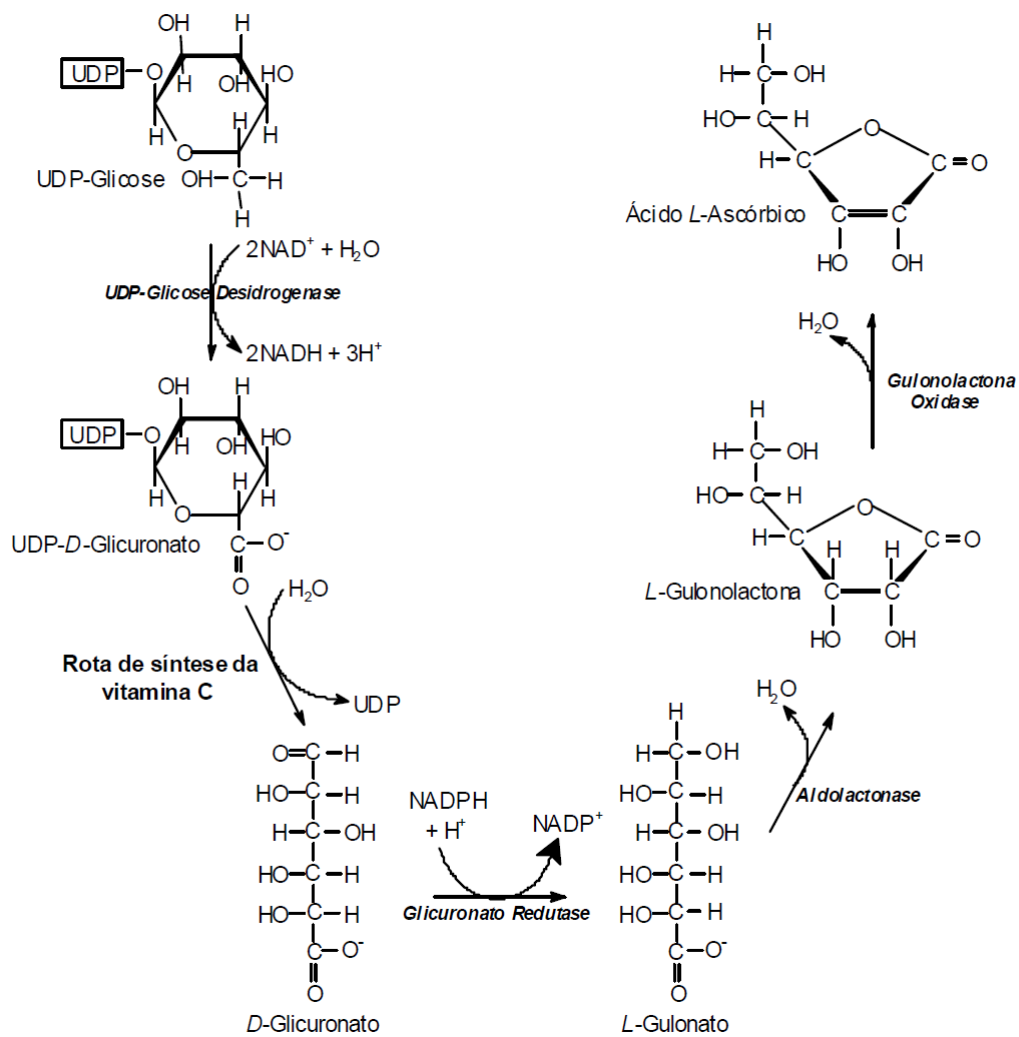


Figura 1: Rota de biossíntese do ácido ascórbico (Nelson e Cox, 2000).

A presença de contaminantes ambientais, como os metais pesados (Yamamoto e Inoue, 1985), além de gerar um ambiente estressante para os organismos aquáticos, aumenta o consumo de vitamina C pelos peixes devido ao processo de desintoxicação dos contaminantes no fígado, causando, assim, uma deficiência funcional desta vitamina. A deficiência de vitamina C pode causar sinais clínicos como: redução na taxa de crescimento, alterações morfológicas (atrofia muscular, deformidades branquiais e operculares), anemia, letargia, escurecimento da pele, redução do consumo de ração, diminuição da resistência imunológica com suscetibilidade a infecções (ectoparasitas, bactérias e fungos), acúmulo de gordura no fígado, dificuldade de cicatrização (perdas das escamas com consequentes lesões na

pele), hemorragias, anorexia e baixa resistência ao estresse (Tacon, 1992; NRC, 1993). Por outro lado, a suplementação com vitamina C exerce uma ação positiva sobre o metabolismo dos peixes (White et al., 1993), e sobre os sistemas estrutural (muscular e ósseo), imunológico e reprodutivo, agindo como cofator de reações de hidroxilação dos aminoácidos prolina e lisina, necessárias para a formação do colágeno presente nos tecidos conjuntivos e ósseo, na cicatrização e na regeneração de lesões. Esta mesma reação de hidroxilação dos aminoácidos é importante para formação e manutenção do tecido adiposo (Chen et al., 2004). Esta vitamina também atua na resposta ao estresse durante a biossíntese da carnitina, a qual está envolvida com o metabolismo de lipídios e o processo de peroxidação, em função da sua ação antioxidante, o que possibilita o bom funcionamento dos órgãos e enzimas (Halver, 2002).

1.4. Processo de biossorção e o *Cocos nucifera* L.

Atualmente, o tratamento de efluentes é um dos mais importantes objetivos para as indústrias, principalmente aquelas cujos efluentes contêm metais pesados, já que estes elementos demandam métodos específicos para serem removidos. Dentre as diferentes alternativas para o tratamento de efluentes que são utilizadas estão: precipitação química, coagulação, adsorção com carvão, troca iônica e processos de separação com membranas. Porém, a aplicação destes processos é frequentemente restrita por razões técnicas ou econômicas, sobretudo para as unidades industriais de pequenas e médias dimensões que proliferam no Brasil (Pagnanelli et al., 2001). O método escolhido deve apresentar baixo custo, pois geralmente se faz necessário tratar grandes volumes de efluentes (Pino et al., 2006). Neste caso, existe a biossorção, a qual apresenta bom desempenho na remoção de diferentes espécies metálicas a um baixo custo, já que podem ser empregados como material biossorvente subprodutos de processamentos industriais, como as indústrias de alimentos e farmacêuticas, processos de fermentação e resíduos agrícolas (Espósito, 2001; Volesky, 2001; Wang e Qin, 2005). A seletividade e a eficiência de algumas biomassas em concentrar e imobilizar alguns metais, mesmo na presença de altas concentrações de outros íons, depende de fatores como: o tipo de biomassa; a natureza do efluente; tipo de preparação e tratamento da biomassa; o ambiente físico-químico do processo; e a presença de outros íons na solução (Garcia-Sanchez e Álvarez-Ayuso, 2002; Volesky, 2004; Pino et al., 2006). São vários os sistemas que

podem ser aplicados no processo de biossorção. Dentre eles se destacam as colunas de leito fixo, os sistemas de leito fluidizado, uma combinação destes dois sistemas, e a bioflotação (Matis et al., 2003; Volesky, 2004).

O coco verde (*Cocos nucifera* L.) é, talvez, a árvore dos trópicos mais reconhecida e uma das mais importantes economicamente. Nos últimos anos, a produção de coco tem incrementado 68% só no estado de São Paulo, pela comercialização de água de coco, que representa 1,4% do consumo de bebidas no Brasil. Este fato traz um sério problema ambiental, pois cerca de 80 a 85% do peso bruto do coco verde, ou seja, a casca do coco, representa lixo. Este problema se agrava principalmente nos centros urbanos, onde esse material é de difícil descarte, sendo enviado para lixões e aterros sanitários (Pino et al., 2006). Este resíduo é um material de difícil decomposição, levando mais de oito anos para sua completa biodegradação. Além da importância econômica e social, há também a importância da utilização da casca do coco verde, sob o ponto de vista ambiental, como material sorvente de grande potencial devido ao seu elevado teor de matéria orgânica composta principalmente por lignina (35-45%) e celulose (23-43%) (Carijo et al., 2002), e biopolímeros reconhecidamente associados à remoção de metais pesados (Hunt, 1986; Gaballah e Kilbertus, 1994; Gaballah et al., 1997).

1.5. Justificativa

Um dos maiores problemas ambientais são os rejeitos decorrentes do desenvolvimento tecnológico. Os efluentes industriais são, neste contexto, um problema particular, pois a natureza não os absorve facilmente. A poluição, e a consequente contaminação por metais pesados, de ecossistemas aquáticos ou terrestres ocorrem de maneira lenta e, por este motivo, pode-se considerar erroneamente que não traz graves efeitos. Porém os metais pesados se acumulam nos organismos e seus efeitos muitas vezes só serão sentidos quando toda a cadeia alimentar estiver com níveis acima dos suportáveis. Assim, procede à preocupação com estes elementos e, cada vez mais, as pesquisas no tratamento de efluentes contaminados devem ser incentivadas (Pinto et al., 2001). Diversas indústrias liberam, dentre outros poluentes, o Cr como rejeito, que, mesmo após sua precipitação (método tradicional de recuperação de Cr) permanece em pequenas quantidades no efluente a ser lançado no corpo receptor. A legislação ambiental brasileira estipula que, exceto para fins específicos, o nível de Cr para águas de uso

doméstico, recreativo e de proteção de comunidades aquáticas seja de 0,5 ppm, limite este bastante baixo e que, portanto, necessita de rigoroso controle (Pinto et al., 2001).

Atualmente têm sido realizados esforços para a utilização das cascas de coco verde como adsorvente para tratar efluentes contaminados devido à abundância e o baixo custo deste material (Al-Asheh et al., 2000; Aldrich e Feng, 2000). A literatura relata a utilização de diversos materiais agroindustriais como potenciais adsorventes na remoção de íons metálicos de águas residuais (Aoyama, 2003; Biomasa, 2013). Entretanto, a maioria dos estudos investiga o processo de preparação de bioadsorvente carbonizado visando o emprego no tratamento de efluentes aquosos contaminados por metais pesados (Biomass, 2013; Carrijo et al., 2002). Porém, o processo de reciclagem do material carbonizado é bastante oneroso (Caziñares, 2000). Por outro lado, poucos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de adsorventes não carbonizados (Chandra et al., 2003). Neste contexto, a utilização da casca de coco verde como adsorvente na remoção de metais tóxicos é uma alternativa barata e simples para minimizar os problemas de poluição urbana e ambiental gerados pela disposição destes resíduos, bem como diminuir os custos no tratamento de efluentes provenientes de pequenas indústrias (Pino et al., 2006).

Partindo do princípio que é crescente a contaminação ambiental por metais pesados e que esses causam efeitos deletérios a saúde da população exposta, existe a necessidade de buscarmos alternativas de prevenção e cura de tais agravos. Dentro desse contexto, os objetivos desse estudo foram avaliar o potencial papel antioxidante da vitamina C na proteção de células contra danos oxidativos induzidos pelo Cr e o potencial da casca do coco verde na adsorção deste metal.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos: avaliar os efeitos da exposição ao cromo hexavalente [Cr (VI)] em diferentes segmentos corporais de *Astyanax aff. bimaculatus*, como brânquias, fígado, testículos, fragmentos de vértebras, intestino, cabeça e músculo, através de parâmetros histopatológicos, enzimáticos e morfométricos; avaliar o poder protetor da vitamina C em animais expostos ao Cr (VI). Paralelamente, objetivou-se analisar o potencial do pó da casca de coco verde no processo de bioabsorção do Cr.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar a concentração de Cr (VI) presente nas brânquias, fígado, testículos, fragmentos de vértebras, intestino, cabeça e músculo, oriundos dos animais expostos ao metal;
- Realizar análises histopatológicas sob microscopia de luz, para avaliar os danos teciduais das brânquias, fígado e testículos;
- Analisar morfometricamente as brânquias, fígado e testículos, a fim de avaliar o impacto do Cr (VI) sobre a capacidade destes órgãos de realizar suas atividades fisiológicas;
- Realizar análises enzimáticas para se avaliar os danos hepático, branquial e muscular desta intoxicação;
- Analisar o efeito protetor da vitamina C nas brânquias, fígado, testículos, fragmentos de vértebras, intestino, cabeça e músculo;
- Avaliar o potencial bioabsorptivo da casca de coco verde em soluções contendo diferentes concentrações de Cr (VI);

- Avaliar o comportamento e mortalidade dos peixes expostos a diferentes concentrações do Cr (VI);
- Avaliar a relação entre o tempo de exposição e as diferentes concentrações de Cr (VI).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Mortalidade e comportamento animal

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo nº 30/2011.

Foram utilizados 140 machos de *Astyanax aff. bimaculatus* adultos, peso corporal e comprimento total médios de $4,49 \pm 0,63$ g e $6,00 \pm 0,47$ cm, respectivamente, procedentes da Estação de Piscicultura da UFV, Viçosa, MG. No período de adaptação dos peixes foram utilizados sete aquários de vidro, cada um com capacidade de 150 L de água livre de cloro por evaporação, mantendo-se 20 peixes por aquário, durante 15 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por filtros submersos e com sistema de aeração contínua da água através de bombas (Sarlo Better 650 L.h⁻¹, Brasil). Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos aquários foi sifonado para eliminar restos de matéria orgânica e imediatamente reposta com água limpa, retornando ao volume inicial. O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz /12 horas-escuro, controlado por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária *ad libitum* com ração comercial para peixes ornamentais (Nutra Fish Básica, Nutravit, São Paulo, Brasil), oferecida duas vezes ao dia, às 08h00min e 17h00min.

Os principais parâmetros de qualidade da água – oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito – foram monitorados todos os dias através de *kits* colorimétricos (Labcon Test, Alcon, Brasil), sendo mantidos dentro dos limites considerados satisfatórios para a espécie (Froese, 2014). A temperatura da água foi mantida a 26 ± 1 °C através de termostatos (Atman 150, Eletronic Heater 150 W, China), conforme níveis recomendados para a espécie (Froese, 2014).

Ao final do período experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10000. Em seguida foi feito aprofundamento da anestesia, e então os animais foram eutanasiados por secção da medula espinhal, na altura do opérculo. De cada exemplar foram registrados os seguintes dados biométricos: comprimento total, comprimento padrão e peso corporal, sendo coletados e pesados brânquias, fígado e testículos. Adicionalmente, músculo, cabeça, intestino e fragmentos de vértebras também foram coletados e armazenados para posterior avaliação da concentração de metal. Fragmentos dos tecidos e órgãos citados foram imersos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e

fragmentos de brânquias, fígado e músculo foram congelados e acondicionados em freezer -80 °C. Para as mensurações utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo 500 - 144B com precisão de 0,02 mm e, para a retirada dos tecidos, tesouras e bisturi cirúrgicos. Os pesos foram obtidos utilizando-se uma balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech, AS 210).

3.2. Grupos experimentais

Durante o período experimental, todos os grupos experimentais continham 20 animais, sendo um grupo controle e 6 grupos tratados. Os animais dos grupos tratados foram expostos a 1,0, 10 e 20 mg.L⁻¹ de Cr (VI), adicionados na água, fornecido na forma de óxido de cromo (CrO₃, Sigma Aldrich, n° 236470, St. Louis, EUA) e receberam ração para peixes ornamentais (Nutra Fish Básica, Nutravit, São Paulo, Brasil) ofertadas a esses animais duas vezes ao dia, às 08h00min e 17h00min. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma:

Grupo Controle – sem metal e com ração comercial não suplementada.

Grupos VitC⁻ – com metal e ração comercial não suplementada.

Grupo 1VitC⁻: recebendo 6,4 mg.L⁻¹ de CrO₃ por dia e ração comercial;

Grupo 10VitC⁻: recebendo 64 mg.L⁻¹ de CrO₃ por dia e ração comercial;

Grupo 20VitC⁻: recebendo 128 mg.L⁻¹ de CrO₃ por dia e ração comercial.

Grupos VitC⁺ – com metal e ração comercial suplementada com Vitamina C (Ascorsil – Vansil Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Grupo 1VitC⁺: recebendo 6,4 mg.L⁻¹ de CrO₃ e ração suplementada com 60 mg.Kg⁻¹ de vitamina C por dia;

Grupo 10VitC⁺: recebendo 64 mg.L⁻¹ de CrO₃ e ração suplementada com 60 mg.Kg⁻¹ de vitamina C por dia;

Grupo 20VitC⁺: recebendo 128 mg.L⁻¹ de CrO₃ e ração suplementada com 60 mg.Kg⁻¹ de vitamina C por dia.

3.3. Períodos de exposição

A exposição dos peixes ao metal foi feita em dois períodos diferentes:

Experimento 1: Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias

Após 15 dias de exposição, 10 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados com o objetivo de verificar as possíveis alterações causadas nesses indivíduos em curto período de exposição ao metal (efeitos agudos) e o possível efeito protetor da vitamina C no organismo dos peixes que a receberam.

Experimento 2: Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias

Após 45 dias de exposição, os 10 animais restantes de cada grupo experimental foram eutanasiados com o objetivo de verificar os efeitos causados nesses indivíduos após exposição subcrônica ao Cr (VI), e o possível efeito protetor da vitamina C no organismo dos peixes que a receberam.

3.4. Determinação da concentração de Cr (VI) nos tecidos

Fragmentos de brânquias, fígado, testículos, vértebras, intestino, cabeça e músculo foram pesados, acondicionados em frascos Erlenmeyer de 25 mL e mantidos em estufa a 70 °C, até alcançarem peso seco constante. Em seguida, as amostras desidratadas foram pesadas e foram adicionados a elas: 1,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 0,5 mL de ácido perclórico 70 % (HClO₄). O material foi colocado em bloco digestor com temperatura inicial de 30 °C, sendo esta gradualmente aumentada até atingir 90 °C, de forma a proporcionar a digestão completa. Após a filtração do material, o filtrado foi utilizado para mensuração das concentrações de Cr sob espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

3.5. Análises histológicas das brânquias, fígado e testículos

Para a histologia das brânquias, foram utilizados fragmentos da região mediana do segundo arco branquial e para a histologia do fígado e dos testículos, as regiões medianas dos mesmos. Fragmentos de brânquias, fígado e testículos permaneceram na solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e foram então transferidos para álcool 70 %. Em seguida, procedeu-se desidratação em série etanólica crescente, com trocas a cada 30 minutos, seguido da inclusão em glicol metacrilato (Historesin®, Leica, Nussloch, Alemanha). Após a inclusão, foram feitas secções seriadas para as brânquias e semisseriadas para fígado e testículos, todas com 3 µm de espessura, utilizando-se navalhas de vidro, em micrótomo

rotativo (Reichert-Jung 2045). As preparações das brânquias e dos testículos foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1 % e as do fígado, com hematoxilina de Mayer e eosina, todas montadas com Entellan® (Merck), e analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX-50). Imagens digitais deste material foram obtidas utilizando fotomicroscópio Olympus CX30.

3.6. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos

As análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos foram conduzidas utilizando-se as imagens digitais obtidas a partir de 10 secções de cada órgão supracitado, observando-se dez campos aleatórios por animal, nas quais foram feitas análises semiquantitativas das patologias encontradas através do cálculo do Valor Médio da Alteração (VMA), o qual se baseia na ocorrência das lesões (Schwaiger et al., 1997), e do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), o qual é baseado na severidade das lesões (Polëksic e Mitrovic-Tutundžic, 1994). O método IAH foi adaptado num estudo anterior (Condessa, 2009) e no presente estudo com o acréscimo de algumas patologias, e utilizado aqui.

3.6.1. Definição das alterações: As definições de alterações leves, moderadas e severas foram modificadas a partir de Polëksic e Mitrovic-Tutundžic, (1994) e caracterizados da seguinte forma:

3.6.1.1. Alterações leves (estágio I): envolvem mudanças que não prejudicam os tecidos. De tal forma se torna possível a reestruturação e recuperação das funções do tecido com a melhoria das condições do meio ambiente. Estas alterações são limitadas a pequenas porções dos tecidos.

3.6.1.2. Alterações moderadas (estágio II): envolvem lesões mais acentuadas e que alteram o funcionamento do órgão. São lesões reparáveis, mas ocorrem em toda a superfície tecidual e se mantem em situações de poluição crônica, levando a alterações graves.

3.6.1.3. Alterações severas (estágio III): lesões cuja recuperação da estrutura tecidual não é possível, mesmo com a melhoria da qualidade da água ou sem qualquer exposição a um estímulo tóxico.

3.6.2. Cálculo do IAH: o valor do IAH foi calculado para cada animal utilizando-se a seguinte fórmula: $IAH = (10^0 \times \Sigma I) + (10^1 \times \Sigma II) + (10^2 \times \Sigma III)$, onde ΣI , ΣII e ΣIII correspondem à soma do número de alterações encontradas pertencentes aos estágios I, II e III, respectivamente.

O valor médio do IAH foi modificado por Condessa (2014) e dividido em 6 categorias: entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão; entre 11 e 32 indicam leves alterações; entre 33 e 54 indicam alterações moderadas no órgão; entre 55 e 76 indicam alterações intensas no órgão; valores entre 76 e 100 indicam lesões severas no órgão, valores acima de 100 indicam alterações irreversíveis no órgão (Tabela 1).

3.6.3. Cálculo do VMA: foi atribuído um valor numérico para cada animal em uma escala de grau (de 0 a 4). Foi calculada, também, uma média do grau de alteração para cada grupo, classificados em discreto (0,1-1,0), moderado (1,1-2,0), intenso (2,1-3,0) e severo (3,1-4,0) (Tabela 2).

3.7. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos

As análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos foram conduzidas utilizando-se as imagens digitais obtidas a partir de 10 secções aleatórias de cada órgão supracitado, observando-se dez campos totalizando 2.660 pontos por animal, com auxílio do programa para análise de imagem Image-Pro Plus.

3.7.1. Análises morfométricas das brânquias – foram contados pontos coincidentes sobre: células pavimentosas, células mucosas, lamela secundária, epitélio filamentar, eritrócitos, célula de pilar e seio venoso central.

3.7.2. Análises morfométricas do fígado – foram contados pontos coincidentes sobre: núcleo de hepatócitos, citoplasma de hepatócitos, hepatócitos binucleados, capilares sinusoides e infiltrados leucocitários. Para determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos foram medidos 30 núcleos/animal.

3.7.3. Análises morfométricas dos testículos – foram contados pontos coincidentes sobre: cisto, intertúbulo, fluido testicular, espermatozoides no lúmen, célula de Sertoli e espermatogônias.

3.8. Análises das enzimas antioxidantes

Inicialmente, foi feito um *pool* de fragmentos dos tecidos branquial, hepático e muscular de 10 animais de cada grupo experimental, até alcançar o peso de 100 mg, para cada tecido. Em seguida, foram realizadas as análises das seguintes enzimas antioxidantes:

3.8.1. Superóxido dismutase – 100 mg dos tecidos supracitados foram homogeneizados em tampão fosfato 50 mmol .L⁻¹, centrifugados a 12000 rpm, 4°C, por 10 minutos, e a atividade enzimática medida no sobrenadante. A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm (Dieterich et al., 2000 modificado) baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O₂⁻ em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol.

3.8.2. Catalase – 100 mg dos tecidos supracitados foram homogeneizados em K-tampão fosfato pH 7,0, com tampão triton X-100 1%, e a suspensão centrifugada a 12000 rpm, 4°C, por 10 minutos, para se determinar a atividade da catalase. A atividade enzimática desta enzima foi mensurada no sobrenadante e determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mmol.L⁻¹) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s (Aebi et al., 1984).

3.8.3. Glutathione S-transferase – 50 mg dos tecidos supracitados foram homogeneizados em 500 µL de tampão fosfato pH 7,4, centrifugados a 12000 rpm, 4°C, por 10 minutos, e a atividade enzimática medida no sobrenadante. A GST foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorvância em 340 nm por 60 s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDBN 340 = 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1976). A atividade da GST foi expressa em µmol min⁻¹.g⁻¹.

3.9. Determinação dos produtos do estresse oxidativo

Inicialmente, foi feito um *pool* de fragmentos dos tecidos branquial, hepático e muscular de 10 animais de cada grupo experimental, até alcançar o peso de 100 mg, para cada tecido. Em seguida, foi realizado o doseamento de proteínas carboniladas:

3.9.1. Proteínas carboniladas – as proteínas carboniladas indicam o dano celular pelas EROs levando à disfunção das proteínas. A concentração de proteínas carboniladas foi determinada nos tecidos supracitados utilizando-se os *pellets* dos homogenatos empregados no método de mensuração das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GST. Os *pellets* foram precipitados em ácido tricloroacético 10 % e centrifugados a 5000 g, 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e aos *pellets* foram adicionados 0,5 mL de solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM. Um total de 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2M foi adicionado aos tubos que representavam o branco de cada amostra, misturados em vórtex e mantidos em temperatura ambiente durante meia hora, no escuro, agitando-se no vórtex a cada 15 minutos. A seguir, 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, gelado, foi adicionado em cada tubo, agitado em vórtex, e os tubos centrifugados a 5000 g, 4° C, por 10 minutos, sendo sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila (1:1), agitado em vórtex, centrifugado e o sobrenadante descartado. Por fim, 1 mL de SDS 6 % foi adicionado aos tubos, os quais foram agitados em vórtex para dissolver o pellet e centrifugados para precipitar os resíduos. Os danos às proteínas foram determinados no sobrenadante final, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotometria a 370 nm (Levine et al., 1990). O total de proteínas carboniladas foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 22000 M.cm⁻¹ e expresso em nmol.mL⁻¹.

3.10. Biossorção e *Cocos nucifera* L.

O pó da casca de coco (*Cocos nucifera* L.), empregado como material biossorvente, foi comprado da empresa Hobby Verde localizada em Brasília/DF. O material foi obtido através da dilaceração, secagem, moagem, classificação, lavagem e secagem da casca de coco. A operação de secagem foi realizada por quatro dias, visando à redução da umidade inicial de 85 % para valores em torno de 15 % a 20 %.

Para testes de bioadsorção, foram utilizados seis frascos Erlenmeyer de 250 mL. O sistema composto por 50 mL de solução a um pH igual a 2, contendo o metal e a biomassa em diferentes concentrações, foi mantido sob agitação em Agitador em velocidade de 175 rpm, e temperatura de 27 °C.

As soluções foram divididas conforme concentrações de metal e casca de coco, bem como por tempo de agitação, da seguinte forma:

Solução 1: contendo 1,0 mg.L⁻¹ de Cr (VI)

Frasco 1.1: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 60 minutos;

Frasco 1.2: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 120 minutos.

Solução 2: contendo 10 mg.L⁻¹ de Cr (VI)

Frasco 2.1: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 60 minutos;

Frasco 2.2: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 120 minutos.

Solução 3: contendo 20 mg.L⁻¹ de Cr (VI)

Frasco 3.1: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 60 minutos;

Frasco 3.2: 5 g.L⁻¹ de pó de casca de coco, agitado por 120 minutos.

Após o período de agitação, realizou-se a filtração das soluções para a separação da biomassa carregada. O filtrado foi utilizado para a determinação das concentrações de Cr em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

3.11. Análises estatísticas

O programa de computador Statistica (StatSoft, EUA) foi utilizado para analisar os resultados referentes à bioadsorção do Cr, concentração de Cr nos tecidos, e morfometria das brânquias, fígado e testículos, através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK), o qual foi usado para comparar médias entre os grupos experimentais. Os resultados do VMA, IAH, análises histopatológicas e análises enzimáticas foram avaliados utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010 (Windows® operating system, EUA) para cálculo de médias e desvios padrão. O nível de significância considerado foi $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidade e comportamento animal

5.1.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias

Em todos os grupos tratados os peixes movimentaram-se intensamente em cardumes e se alimentaram normalmente, mostrando comportamento semelhante ao Grupo Controle. Não houve mortalidade dos peixes, em qualquer grupo, até o final do experimento (Tabela 3).

5.1.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias

Houve mortalidade dos peixes nos grupos 20VitC⁻ e 20VitC⁺ a partir do 22^o dia de tratamento. Nos demais grupos não houve mortalidade dos animais até o final do experimento (Tabela 3). A morte dos peixes foi precedida de comportamento anormal, permanecendo estes próximos à superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia. Aqueles que sobreviveram, reduziram a ingestão de alimento. Por outro lado, os animais do Grupo Controle, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentaram normalmente.

5.2. Determinação da concentração de Cr nos tecidos

5.2.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias

Foram detectados níveis variados de Cr em todos os fragmentos de tecidos avaliados, dos animais expostos a diferentes concentrações do Cr (VI) (Tabela 4). As brânquias, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (26,65±1,59 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (57,66±0,10 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 10VitC⁺ (14,91±0,05 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (13,54±4,87 mg.g⁻¹).

O fígado, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 1VitC⁻ (40,5±6,36 mg.g⁻¹), 10VitC⁻ (45,42±1,76 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (75,89±3,61 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (8,91±0,50 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (43,5±2,12 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (18,41±1,29 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Os testículos, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 20VitC⁻ (29,31±7,50 mg.g⁻¹), em

relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (3,34±0,76 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (2,74±0,92 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (5,96±0,23 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Os fragmentos das vértebras, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (18,94±0,98 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (18,63±0,55 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (2,30±0,18 mg.g⁻¹) e 10VitC⁺ (4,28±0,56 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

O intestino, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (63,34±4,52 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (73,252,91mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (22,26±1,03 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (15,942,93 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (27,792,77 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Todos os animais expostos aos grupos VitC⁻ e VitC⁺ o acumulo do Cr (VI) na cabeça não apresentaram diferença significativa (Tabela 4).

Os fragmentos de músculo, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal no grupo exposto a 20VitC⁻ (4,580,80 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (1,44±0,25 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (3,54±0,33 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (2,37±0,02 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

5.2.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias

Foram detectados níveis variados de Cr em todos os fragmentos de tecidos avaliados, dos animais expostos a diferentes concentrações do Cr (VI) (Tabela 4). As brânquias, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (31,02±2,91 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (73,57±2,56 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (5,15±1,02 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (18,20±2,91 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (16,41±1,03 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

O fígado, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (58,76±2,35 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (82,251,16 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (16,58±2,39 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (49,40±1,29 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (25,22±2,39 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Os testículos, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 1VitC⁻ (15,04±2,09 mg.g⁻¹), 10VitC⁻ (39,78±2,11 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (59,55±3,20 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (2,02±0,53 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (2,24±0,21 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (4,96±1,18 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Os fragmentos das vértebras, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 10VitC⁻ (19,28±1,13 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (38,57±1,00 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (5,78±0,14 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (6,50±1,41 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (11,71±1,59 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

O intestino, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 1VitC⁻ (36,59±0,26 mg.g⁻¹), 10VitC⁻ (68,43±2,21 mg.g⁻¹) e 20VitC⁻ (97,90±3,29 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (24,81±2,43 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (19,44±2,01 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (28,93±1,32 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

A cabeça, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal nos grupos expostos a 20VitC⁻ (22,65±1,69 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (0,80±0,01 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (5,08±0,67 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (8,98±0,34 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

Os fragmentos de músculo, de todos os animais, apresentaram os maiores níveis de acumulações do metal no grupo exposto a 20VitC⁻ (10,0±0,58 mg.g⁻¹), em relação aos animais dos grupos 1VitC⁺ (0,65±0,14 mg.g⁻¹), 10VitC⁺ (6,04±1,03 mg.g⁻¹) e 20VitC⁺ (4,37±0,02 mg.g⁻¹) (Tabela 4).

5.3. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos

5.3.1. Histopatologia das brânquias

As brânquias dos peixes mantidos em aquários sem adição do Cr – Grupo Controle – apresentaram aspecto normal (Figura 2).

5.3.1.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias

5.3.1.1.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio I: dilatação dos canais vasculares, aumento do espaço interlamelar secundário, hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar, deformação da lamela primária, redução do espaço interlamelar secundário, fusão e desorganização da lamela secundária (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A dilatação dos canais vasculares foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (75 %) e 10VitC⁻ (50 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (33,33 %), 10VitC⁺ (83,33 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

O aumento do espaço interlamelar secundário foi observado nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (50 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (83,3 %) e 20VitC⁺ (80 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (50 %) e 20VitC⁻ (20 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (90 %), 10VitC⁺ (93,33 %) e 20VitC⁺ (35 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A deformação da lamela primária foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (50 %), 10VitC⁻ (40 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (80 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A redução do espaço interlamelar secundário foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (65 %), 10VitC⁻ (30 %) e 20VitC⁻ (20 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (23,33 %), 10VitC⁺ (46,66 %) e 20VitC⁺ (15 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A fusão e desorganização da lamela secundária foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (30 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

5.3.1.1.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: hipertrofia e hiperplasia das células mucosas, ruptura do epitélio lamelar, hipertrofia e hiperplasia das células de cloro, descamação do epitélio (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias das células mucosas foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (10 %) e 20VitC⁻ (100 %) . Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A ruptura do epitélio lamelar foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (30 %) e 20VitC⁻ (100 %) . Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias das células de cloro foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (40 %) e 20VitC⁻ (100 %) . Entretanto,

essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

A descamação do epitélio foi observada em 20 % dos peixes dos grupos: 10VitC⁻ e 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi observada em 1VitC⁺ (16,66 %) e 20VitC⁺ (85 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

5.3.1.1.3. Alterações severas (Estágio III): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio III: vacuolizações, necroses e degenerações celulares e aneurismas lamelares (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

As vacuolizações foram observadas em 100 % dos peixes do grupo 1VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi observada em 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (50 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

As necroses e degenerações celulares foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (65 %), 10VitC⁻ (10 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 1VitC⁺ (13,33 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

Os aneurismas lamelares foram observados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (50 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 3A – 3F e Tabela 5).

5.3.1.1.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): Os valores médios do IAH branquial dos grupos VitC⁻ foram de: 15,04 (1VitC⁻), 19,16 (10VitC⁻) e 14,41 (20VitC⁻). Ao passo que o IAH branquial dos grupos VitC⁺ foi de: 12,30 (1VitC⁺), 16,47 (10VitC⁺) e 19,16 (20VitC⁺) (Figura 3G).

5.3.1.1.5. Valor Médio da Alteração (VMA):

A dilatação dos canais vasculares foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como discreta e no grupo 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

O aumento do espaço interlamelar secundário foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como discreta, 10VitC⁻ como não observada e 20VitC⁻ como

moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada como moderada nos peixes dos grupos 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasias do epitélio foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta e 10VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta, e dos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A deformação da lamela primária foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como discreta e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como severa e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A redução do espaço interlamelar secundário foi classificado nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como discreta e no grupo 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada como discreta nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 6).

A fusão e desorganização da lamela secundária foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada e do grupo 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como severa, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasia das células mucosas foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada e 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como discreta, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A ruptura do epitélio lamelar foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada, e 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como severa, e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasias das células de cloro foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como moderada, e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como severa e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A descamação do epitélio foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como não observada, e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁺ como discreta e 10VitC⁺ como não observada, e no 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As vacuolizações foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como moderada e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como não observada, e nos grupos 10VitC⁺ como moderada e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 6).

As necroses e degenerações celulares foram classificadas nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

Os aneurismas lamelares foram classificados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como moderada, e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

5.3.1.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias

5.3.1.2.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio I: dilatação dos canais vasculares, aumento do espaço interlamelar secundário, hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental, deformação da lamela primária, redução do espaço interlamelar secundário, fusão e desorganização da lamela secundária (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A dilatação dos canais vasculares foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (52 %) e 10VitC⁻ (45 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (33,33 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

O aumento do espaço interlamelar secundário foi observado nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (70 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 20VitC⁺ (80 %3) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (60 %) e 20VitC⁻ (20 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (75 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A deformação da lamela primária foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (1000 %), 10VitC⁻ (65 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi

observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A redução do espaço interlamelar secundário foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (8 %) e 10VitC⁻ (45 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (50 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (20 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A fusão e desorganização da lamela secundária foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %) e 10VitC⁻ (65 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

5.3.1.2.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: hipertrofia e hiperplasia das células mucosas, ruptura do epitélio lamelar, hipertrofia e hiperplasia das células de cloro, descamação do epitélio (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias das células mucosas foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %) e 10VitC⁻ (30 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100% dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A ruptura do epitélio lamelar foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (45 %) e 20VitC⁻ (100 %) . Entretanto, essa alteração foi observada em 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (60 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

As hipertrofias e hiperplasias das células de cloro foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (60 %) e 20VitC⁻ (100 %) . Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

A descamação do epitélio foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (6 %), 10VitC⁻ (25 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 1VitC⁺ (16,66 %) e 20VitC⁺ (85 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

5.3.1.2.3. Alterações severas (Estágio III): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio III: vacuolizações, necroses e degenerações celulares e aneurismas lamelares (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

As vacuolizações foram observadas em 100 % dos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁺ e em 50 % dos animais do grupo 20VitC⁺ (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

As necroses e degenerações celulares foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (55 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos animais dos grupos 1VitC⁺ (50 %), 10VitC⁺ (100 %) e 20VitC⁺ (100 %) (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

Os aneurismas lamelares foram observados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (85 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 4A – 4F e Tabela 5).

5.3.1.2.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): Os valores médios do IAH branquial dos grupos VitC⁻ foram de: 15,72 (1VitC⁻), 14,41 (10VitC⁻) e 21,18 (20VitC⁻). Ao passo que o IAH branquial dos grupos VitC⁺ foi de: 15,04 (1VitC⁺), 16,75 (10VitC⁺) e 18,15 (20VitC⁺) (Figura 4G).

5.3.1.2.5. Valor Médio da Alteração (VMA):

A dilatação dos canais vasculares foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como discreta, e o grupo 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

O aumento do espaço interlamelar secundário foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻ como discreta e no grupo 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada e no grupo 10VitC⁺ como não observada (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasias do epitélio foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como discreta e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta e no grupo 10VitC⁺ como discreta (Tabela 6).

A deformação da lamela primária foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada e no grupo 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada como moderada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 6).

A redução do espaço interlamelar secundário foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como discreta e no grupo 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta e no grupo 10VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A fusão e desorganização da lamela secundária foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como moderada, 10VitC⁻ como discreta e 20VitC⁻ não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasia das células mucosas foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como moderada, 10VitC⁻ como discreta e 20VitC⁻ não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A ruptura do epitélio lamelar foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada e no grupo 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As hipertrofias e hiperplasias das células de cloro foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

A descamação do epitélio foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como discreta, 10VitC⁻ como não observada e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta, no grupo 10VitC⁺ como não observada e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

As vacuolizações foram classificadas nos peixes do grupo 1VitC⁻ como moderada, no grupo 10VitC⁻ como discreta e no grupo 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como não observada, 10VitC⁺ como moderada e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 6).

As necroses e degenerações celulares foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada e 10VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

Os aneurismas lamelares foram classificados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 6).

5.3.2. Histopatologia do fígado

O fígado dos peixes mantidos em aquários sem adição do Cr e da vitamina C (Grupo Controle) apresentou histologia normal (Figura 5).

5.3.2.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias

5.3.2.1.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio I: infiltração leucocitária, vacuolização hepatocelular e hipertrofias e hiperplasias de hepatócitos (Figura 6A – 6F e tabela 7).

As infiltrações leucocitárias foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (25 %), 10VitC⁻ (90 %) e 20VitC⁻ (93,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (50 %), 10VitC⁺ (46,66 %) e 20VitC⁺ (40 %) (Figura 6A – 6F e tabela 7).

A vacuolização hepatocelular foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (80 %), 10VitC⁻ (90 %) e 20VitC⁻ (90 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 6A – 6F e tabela 7).

As hipertrofias e hiperplasias de hepatócitos foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (80 %), 10VitC⁻ (40 %) e 20VitC⁻ (13,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (26,66 %), 10VitC⁺ (26,66 %) e 20VitC⁺ (65 %) (Figura 6A – 6F e tabela 7).

5.3.2.1.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: núcleos picnóticos, desorganização do cordão hepática e congestão do cordão hepático (Figura 6A – 6F e tabela 7).

Núcleos picnóticos foram observados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (95 %), 10VitC⁻ (80 %) e 20VitC⁻ (96,66 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (83,33 %), 10VitC⁺ (70 %) e 20VitC⁺ (55 %) (Figura 6A – 6F e tabela 7).

A desorganização do cordão hepático foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (90 %), 10VitC⁻ (90 %) e 20VitC⁻ (93,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 6A – 6F e tabela 7).

A congestão sanguínea e a dilatação do sinusoide foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (5 %), 10VitC⁻ (20 %) e 20VitC⁻ (23,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (36,66 %), 10VitC⁺ (23,33 %) e 20VitC⁺ (25 %) (Figura 6A – 6F e tabela 7).

5.3.2.1.3. Alterações severas (Estágio III):

Os animais expostos ao poluente apresentaram a seguinte alteração pertencente ao estágio III: necrose e degeneração de hepatócitos (Figura 6A – 6F e tabela 7).

A necrose e degenerações de hepatócitos foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (90 %) e 20VitC⁻ (30 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 6A – 6F e tabela 7).

5.3.1.2.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): Os valores médios do IAH hepático dos grupos experimentais que não receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁻) foram: 12,09 (1VitC⁻), 13,3 (10VitC⁻) e 12,09 (20VitC⁻). Enquanto isso, o IAH hepático dos grupos experimentais que receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁺) apresentou exatamente o mesmo valor para todos os grupos, sendo 12,09 (Figura 6G).

5.3.1.2.5. Valor Médio da Alteração (VMA):

A infiltração leucocitária foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁻ como discreta e dos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada como discreta nos peixes dos grupos 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

A vacuolização hepatocelular foi classificada como moderada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 8).

A hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como moderada, e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ como discreta e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

Núcleos picnóticos foram classificados nos peixes do grupo 10VitC⁻ como moderada e nos grupos 1VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração

foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 10VitC⁺ como moderada, e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

O desarranjo da estrutura do parênquima foi classificado como moderado nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 8).

A congestão sanguínea e dilatação do sinusóide foram classificadas como discreta nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

A necrose e degenerações de hepatócitos foram classificadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻ como moderadas e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada como moderada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 8).

5.3.2.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias

5.3.2.2.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio I: infiltração de linfócitos, vacuolização hepatocelular e hipertrofias e hiperplasias de hepatócitos.

As infiltrações leucocitárias foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (66 %), 10VitC⁻ (95,40 %) e 20VitC⁻ (60 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (45 %), 10VitC⁺ (60 %) e 20VitC⁺ (25 %) (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

A vacuolização hepatocelular foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (64 %), 10VitC⁻ (100 %) e 20VitC⁻ (80 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

As hipertrofias e hiperplasias de hepatócitos foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (32 %), nos demais grupos VitC⁻ essa alteração não foi observada. Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 10VitC⁺ (30 %) e 20VitC⁺ (35 %), já no 1VitC⁺ essa alteração não foi observada (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

5.3.2.2.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: núcleos picnóticos, desarranjo da estrutura do parênquima e congestão do cordão hepático (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

Núcleos picnóticos foram observados nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (44 %), 10VitC⁻ (90 %) e 20VitC⁻ (90 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (82 %), 10VitC⁺ (60 %) e 20VitC⁺ (50 %) (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

A desarranjo da estrutura do parênquima foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (68 %), 10VitC⁻ (100 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

A congestão sanguínea e a dilatação do sinusóide foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (42 %), 10VitC⁻ (55 %) e 20VitC⁻ (40 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (61 %), 10VitC⁺ (40 %) e 20VitC⁺ (25 %) (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

5.3.2.2.3. Alterações severas (Estágio III): Os animais expostos ao poluente apresentaram a seguinte alteração pertencente ao estágio III: necrose e degeneração de hepatócitos (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

A necrose e degenerações de hepatócitos foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (72 %), 10VitC⁻ (85 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁺ (60 %) e 20VitC⁺ (85 %) (Figura 7A – 7F e Tabela 7).

5.3.2.2.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): Os valores médios do IAH hepático dos grupos experimentais que não receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁻) foram: 12,09 (1VitC⁻), 13,3 (10VitC⁻) e 12,09 (20VitC⁻). Enquanto isso, o IAH hepático dos grupos experimentais que receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁺) foi: 14,67 (1VitC⁺) e 12,09 (10VitC⁺ e 20VitC⁺) (Figura 7G).

5.3.2.2.5. Valor Médio da Alteração (VMA):

A infiltração leucocitária foi classificada como discreta nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

A vacuolização hepatocelular foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ como discreta e 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi

classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 8).

A hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos foram classificadas nos peixes do grupo 1VitC⁻ como discreta e dos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como não observada e dos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

Núcleos picnóticos foram classificados nos peixes do grupo 1VitC⁻ como discreta e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como moderada e nos grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

O desarranjo da estrutura do parênquima foi classificado nos peixes do grupo 1VitC⁻ como discreta e dos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada como moderada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 8).

A congestão sanguínea e dilatação do sinusóide foram classificadas como discretas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻, 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Tabela 8).

A necrose e degenerações de hepatócitos foram classificadas nos peixes do grupo 1VitC⁻ como discreta e dos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada, e o grupo 10VitC⁺ como discreta (Tabela 8).

5.3.3. Histopatologia dos testículos

Os testículos dos peixes mantidos em aquários sem adição do Cr (Grupo Controle) e da vitamina apresentaram histologia normal (Figura 8).

5.3.3.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias:

5.3.3.1.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram a seguinte alteração pertencente ao estágio I: dilatação intertubular (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

A dilatação intertubular foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (55 %), 10VitC⁻ (10 %) e 20VitC⁻ (13,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 5 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 10VitC⁺, já no grupo 20VitC⁺ essa alteração não foi observada (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

5.3.3.1.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: agrupamento nuclear, vacuolização e ruptura de cistos (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

O agrupamento nuclear foi observado nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (60 %), 10VitC⁻ (100 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada em 100 % nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

A vacuolização foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (95 %), 10VitC⁻ (80 %) e 20VitC⁻ (76,66 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (25 %), 10VitC⁺ (100%) e 20VitC⁺ (70 %) (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

A ruptura de cistos foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 10VitC⁻ (40 %) e 20VitC⁻ (36,66 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (30 %) e 20VitC⁺ (60 %) (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

5.3.3.1.3. Alterações severas (Estágio III): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio III: necroses e degenerações, e núcleos picnóticos (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

As necroses e degenerações foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (75 %), 10VitC⁻ (70 %) e 20VitC⁻ (33,33 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (25 %), 10VitC⁺ (10%) e 20VitC⁺ (40 %) (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

Os núcleos picnóticos foram observados em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 20VitC⁻, e em 90 % do grupo 10VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 20VitC⁺, e em 10 % do grupo 10VitC⁻ (Figura 9A – 9F e Tabela 9).

5.3.3.1.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): os valores médios do IAH testicular dos grupos experimentais que não receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁻) foram: 19,25 (1VitC⁻), 19,25 (10VitC⁻) e 16,50 (20VitC⁻). Ao passo que o IAH testicular para os animais que receberam a ração suplementada com vitamina C (VitC⁺) foi: 21 (C⁺), 22,10 (10 VitC⁺) e 46 (20VitC⁺) (Figura 9G).

5.3.3.1.5. Valor Médio da Alteração (VMA): a dilatação intertubular foi classificada como discreta nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 10VitC⁺ como discreta e no grupo 20VitC⁺ como não observada (Tabela 10).

O agrupamento nuclear foi classificada como moderada nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como severa, 10VitC⁺ como moderada e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 10).

A vacuolização foi classificada como moderada nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻, 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes do grupo 1VitC⁺ como discreta e os grupos 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 10).

A ruptura de cistos foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como discreta, 10VitC⁺ como não observada e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 10).

As necroses e degenerações foram classificadas nos peixes dos grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ como moderada e grupo 20VitC⁻ como discreta. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺, 10VitC⁺ e 20VitC⁺ como discreta (Tabela 10).

O núcleo picnótico foi classificada nos peixes dos grupos 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻ como moderado. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ como intensa, 10VitC⁺ como discreta e 20VitC⁺ como moderada (Tabela 10).

5.3.3.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias:

5.3.3.2.1. Alterações leves (Estágio I): Os animais expostos ao poluente apresentaram a seguinte alteração pertencente ao estágio I: dilatação intertubular (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

A dilatação intertubular foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (10 %), 10VitC⁻ (15 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (5 %), 10VitC⁺ (30 %), já no grupo 20VitC⁺ essa alteração não foi observada (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

5.3.3.2.2. Alterações moderadas (Estágio II): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio II: agrupamento nuclear, vacuolização e ruptura de cistos (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

O agrupamento nuclear foi observado em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁻ e 10VitC⁻, e no grupo 20VitC⁻ não foi observado. Entretanto, essa alteração foi observada em 90 % nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ e 20VitC⁺, e no grupo 10VitC⁺ essa alteração não foi observada (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

A vacuolização foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (100 %), 10VitC⁻ (89,5 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (25 %), 10VitC⁺ (30 %) e 20VitC⁺ (20 %) (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

A ruptura de cistos foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (30 %), 10VitC⁻ (50 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada somente em 30 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

5.3.3.2.3. Alterações severas (Estágio III): Os animais expostos ao poluente apresentaram as seguintes alterações pertencentes ao estágio III: necroses e degenerações, e núcleos picnóticos (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

As necroses e degenerações foram observadas nos peixes dos grupos: 1VitC⁻ (84 %), 10VitC⁻ (85 %) e 20VitC⁻ (100 %). Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (15 %), 10VitC⁺ (10%) e 20VitC⁺ (10 %) (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

Os núcleos picnóticos foram observados em 100 % dos peixes dos grupos: 1VitC⁻, 10VitC⁻ e 20VitC⁻. Entretanto, essa alteração foi observada nos peixes dos grupos: 1VitC⁺ (100 %), 10VitC⁻ (20 %) e 20VitC⁺ (90 %) (Figura 10A – 10F e Tabela 9).

5.3.3.2.4. Índice de Alterações Histológicas (IAH): os valores médios do IAH testicular dos grupos experimentais que não receberam a ração suplementada com a vitamina C (VitC⁻) foram: 19,33 (1VitC⁻), 17,77 (10VitC⁻) e 17,58 (20VitC⁻). Ao passo que o IAH testicular para os animais que receberam a ração suplementada com vitamina C (VitC⁺) foi: 21 (C⁺), 24,56 (10 VitC⁺) e 38,33 (20VitC⁺) (Figura 10G).

5.3.3.2.5. Valor Médio da Alteração (VMA): a dilatação intertubular foi classificada nos peixes dos grupos 1Vit⁻ e 10Vit⁻ como discreta e do grupo 20Vit⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1Vit⁺ e 10Vit⁺ como discreta e do grupo 20Vit⁺ como não observada (Tabela 10).

O agrupamento nuclear foi classificada nos peixes dos grupos: 1Vit⁻ e 10Vit⁻ como moderada e 20Vit⁻ como não observada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos 1Vit⁺ e 20Vit⁺ como moderada e o grupo 10Vit⁺ como não observada (Tabela 10).

A vacuolização foi classificada nos peixes dos grupos 1Vit⁻, 10Vit⁻ e 20Vit⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada como discreta nos peixes dos grupos 1Vit⁺, 10Vit⁺ e 20Vit⁺ (Tabela 10).

A ruptura de cistos foi classificada nos peixes do grupo 1Vit⁻ como discreta e dos grupos 10Vit⁻ e 20Vit⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1Vit⁺, 10Vit⁺ e 20Vit⁺ como não observada (Tabela 10).

As necroses e degenerações foram classificadas nos peixes dos grupos 1Vit⁻, 10Vit⁻ e 20Vit⁻ como moderada. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1Vit⁺, 10Vit⁺ e 20Vit⁺ como discreta (Tabela 10).

O núcleo picnótico foi classificada nos peixes dos grupos 1Vit⁻, 10Vit⁻ e 20Vit⁻ como moderado. Entretanto, essa alteração foi classificada nos peixes dos grupos: 1Vit⁺ e 20Vit⁺ como moderada, 10Vit⁺ como discreta (Tabela 10).

5.4. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos

5.4.1. Análises morfométricas das brânquias

5.4.1.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias: As células pavimentosas encontradas nas lamelas secundárias das brânquias não foram verificadas diferenças significativas da quantidade destas células nos animais dos grupos 1Vit⁻ (8,14±1,06), 10Vit⁻ (17,9±1,34) e 20Vit⁻ (4,3±1,45), quando comparados com o Grupo Controle (1,3±0,45). Enquanto isso, o grupo 10Vit⁺ (46,7±1,41) apresentou maior quantidade destas células em relação aos grupos não suplementados com a vitamina C e ao Grupo Controle (Tabela 11).

A presença de células mucosas foram maiores nas brânquias dos animais expostos a 10Vit⁻ (11,5±2,10) e 20Vit⁻ (6,2±4,55) em relação aos animais do

Grupo Controle ($1,5 \pm 0,87$). Entretanto, nos grupos 1VitC^+ ($2,0 \pm 0,16$), 10VitC^+ ($6,1 \pm 3,47$) e 20VitC^- ($7,2 \pm 3,89$) a presença destas células foi menor, em comparação com o grupo 10VitC^- ($11,5 \pm 2,10$) (Tabela 11).

A quantidade de lamelas secundárias foi menor nos animais do grupo 1VitC^- ($22,0 \pm 4,21$) em relação ao Grupo Controle ($54,8 \pm 1,07$) e aos demais grupos 10VitC^- ($69,18 \pm 0,93$) e 20VitC^- ($53,66 \pm 1,84$). Nos grupos 1VitC^+ ($50,5 \pm 1,33$), 10VitC^+ ($79,3 \pm 2,17$) e 20VitC^+ ($50,9 \pm 1,90$), a quantidade lamelas secundárias foi maior em comparação com o grupo 1VitC^- ($22,0 \pm 4,21$) (Tabela 11).

A alteração no número de eritrócitos foi verificada nos grupos VitC^- em quantidades similares ao Grupo Controle ($10,1 \pm 0,72$). No grupo 10VitC^+ ($23,0 \pm 4,76$), estas células foram observadas em maior quantidade, quando comparados aos grupos 1VitC^- ($9,38 \pm 0,49$), 10VitC^- ($13,5 \pm 1,84$) e 20VitC^- ($4,36 \pm 0,61$) (Tabela 11).

Quanto à alteração no número de células de pilar, estas foram observadas em maior quantidade no grupo 10VitC^- ($9,9 \pm 3,52$), quando comparado ao Grupo Controle ($1,9 \pm 0,22$). Os animais expostos a 10VitC^+ ($5,4 \pm 1,22$) apresentaram quantidade reduzida destas células em comparação com o grupo 10VitC^- ($9,9 \pm 3,52$) e aumentada em relação ao grupo 1VitC^- ($0,5 \pm 0,28$) (Tabela 11).

Quantidade de seio venoso central foi maior nos animais expostos a 1VitC^- ($47,5 \pm 2,18$), 10VitC^- ($81 \pm 3,76$), quando comparados ao Grupo Controle ($6,5 \pm 1,41$). No grupo 1VitC^+ ($7,5 \pm 1,76$) a quantidade deste constituinte tecidual foi menor em comparação com os grupos 1VitC^- ($47,5 \pm 2,18$) e 10VitC^- ($81 \pm 3,76$), sendo que no grupo 10VitC^+ ($69,5 \pm 2,55$) a quantidade foi superior à verificada no grupo 20VitC^- ($22,4 \pm 2,79$) (Tabela 11).

Em relação à quantidade de epitélio filamentar não foi verificada diferença significativa entre o Grupo Controle e os grupos VitC^- e VitC^+ (Tabela 11).

5.4.1.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45

dias: Foi verificada maior quantidade de células pavimentosas nas lamelas secundárias das brânquias dos animais dos grupos 1VitC^- ($8,1 \pm 1,758$), 10VitC^- ($17,9 \pm 4,12$) e 20VitC^- ($10,4 \pm 3,65$), quando comparados com o Grupo Controle ($1,3 \pm 0,06$). O grupo 10VitC^+ ($24,5 \pm 5,21$) apresentou maior quantidade destas células em relação aos grupos não suplementados com a vitamina C. Ao passo que nos

grupos 1VitC⁺ (7,7±1,89) e 20VitC⁺ (3,3±0,31) a quantidade destas células foi menores, quando comparado ao grupo 10VitC⁻ (17,9±4,12) (Tabela 11).

A presença de células mucosas foram maiores nas brânquias dos animais expostos a 10VitC⁻ (11,5±4,61) e 20VitC⁻ (10,2±1,45) em relação ao Grupo Controle (1,5±0,87). No grupo 10VitC⁺ (23,5±6,61) a quantidade desta célula foi maior, comparado aos grupos que não receberam a suplementação da vitamina C (Tabela 11).

A quantidade de lamelas secundárias foi menor nos animais do grupo 1VitC⁻ (18,8±1,51) e maior no grupo 10VitC⁻ (69,1±7,31), em comparação com o Grupo Controle (54,8±5,07). Nos grupos 1VitC⁺ (37,5±3,21), 10VitC⁺ (99,0±7,02) e 20VitC⁺ (57,3±5,04), verificou-se que a quantidade de lamelas secundárias foi superior aos respectivos grupos 1VitC⁻ (18,8±1,51), 10VitC⁻ (69,1±7,31) e 20VitC⁻ (43,2±2,41) (Tabela 11).

Em relação à quantidade de eritrócitos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados (VitC⁻ e VitC⁺) e o Grupo Controle (Tabela 11).

As células de pilar foram observadas em maior quantidade nos animais dos grupos 10VitC⁻ (9,9±0,12) e 20VitC⁻ (11,3±2,96), em relação ao Grupo Controle (1,5±0,22). Estas células foram verificadas em maior quantidade no grupo 10VitC⁺ (20,5±3,02), quando comparado aos grupos que não receberam a suplementação da vitamina C (Tabela 11).

Quantidade de seio venoso central foi consideravelmente maior em todos os grupos que não receberam a vitamina C: 1VitC⁻ (46,5±3,88), 10VitC⁻ (81±5,25) e 20VitC⁻ (51,2±2,31), em comparação com o Grupo Controle (6,5±1,41). Os grupos 1VitC⁺ (7,0±1,29), 10VitC⁺ (59,9±3,03) e 20VitC⁺ (23,0±3,07) apresentaram redução da quantidade deste constituinte tecidual em comparação com os respectivos grupos 1VitC⁻ (46,5±3,88), 10VitC⁻ (81±5,25) e 20VitC⁻ (51,2±2,31) (Tabela 11).

Epitélio filamentar das brânquias dos animais do grupo 10VitC⁻ (69,1±6,57) apresentou quantidade elevada, em relação ao Grupo Controle (33±3,69). Os grupos 1VitC⁺ (31,2±2,98) e 20VitC⁺ (34,0±2,75) apresentaram menores quantidades deste constituinte tecidual, em relação ao grupo 10VitC⁻ (69,1±6,57) (Tabela 11).

5.4.2. Análises morfométricas do fígado

5.4.2.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15

dias: Verificou-se que a quantidade do citoplasma de hepatócitos foi maior nos animais do grupo 1VitC⁻ (201,5±4,03) em relação aos animais do Grupo Controle (129,8± 0,46) e dos grupos 10VitC⁻ (146,8±0,66) e 20VitC⁻ (139,6±1,03). Uma menor quantidade deste constituinte tecidual foi observada nos grupos 1VitC⁺ (148,5±1,12), 10VitC⁺ (99,2±0,66) e 20VitC⁺ (118,0±0,51), quando comparados com o grupo 1VitC⁻ (201,5±4,03) (Tabela 12).

A quantidade de hepatócitos mononucleares foi maior nos animais dos grupos VitC⁻, principalmente no grupo 20VitC⁻ (60,6±9,71), em relação ao Grupo Controle (6,1±1,52). Nos grupos 1VitC⁺ (6,1±1,89), 10VitC⁺ (10,1±1,44) e 20VitC⁺ (2,2±0,30), a quantidade deste constituinte tecidual foi inferior aos grupos 1VitC⁻ (26,2±4,33), 10VitC⁻ (40,1±6,67) e 20VitC⁻ (60,6±9,71). A quantidade de hepatócitos binucleados dos grupos 1VitC⁻ (1,1±0,38), 10VitC⁻ (4,5±1,25) e 20VitC⁻ (5,5±1,87) foi similar à verificada no Grupo Controle (3,1±1,71). Nos animais dos grupos 1VitC⁺ (41,6±3,99), 10VitC⁺ (33,5±3,18) e 20VitC⁺ (80,3±5,06), a quantidade destes núcleos foi maior em relação aos grupos que não receberam suplementação da vitamina C (Tabela 12).

A presença de infiltrados leucocitários nos animais do grupo 20VitC⁻ (22,9±9,47) foi superior em relação aos grupos 1VitC⁻ (6,1±1,75), 10VitC⁻ (12,8±1,67) e Controle (3,9±0,86) (Figura 19). A quantidade deste constituinte tecidual foi inferior nos grupos 1VitC⁺ (12,3±1,99), 10VitC⁺ (7,4±1,76) e 20VitC⁺ (11,5±1,63) em relação ao grupo 20VitC⁻ (22,9±9,47) e similar aos grupos 1VitC⁻ (6,1±1,75) e 10VitC⁻ (12,8±1,67) (Tabela 12).

A quantidade de capilares sinusoides não apresentou diferença significativa nos grupos 1VitC⁻ (14,4±0,50), 10VitC⁻ (21,4±1,37) e 20VitC⁻ (23,5±1,04), em comparação ao Grupo Controle (7,9±0,74). Nos grupos 1VitC⁺ (54,95±0,45) e 10VitC⁺ (76,9±2,76) a quantidade deste constituinte tecidual foi superior aos animais dos grupos 1VitC⁻ (14,4±0,50), 10VitC⁻ (21,4±1,37) e 20VitC⁻ (23,5±1,04) (Tabela 12).

Houve aumento significativo do diâmetro nuclear de hepatócitos dos lambaris do grupo 20VitC⁻ (4,7±0,21) em relação aos grupos 1VitC⁻ (1,2±0,12), 10VitC⁻ (1,6±0,64) e controle (1,8±0,10). O grupo 10VitC⁺ (5,5±0,19) também apresentou aumento do diâmetro nuclear de hepatócitos, quando comparado aos grupos 1VitC⁻ (1,2±0,12), 10VitC⁻ (1,6±0,64) e 20VitC⁻ (4,7±0,21) (Tabela 12).

5.4.2.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45

dias: Verificou-se que a quantidade do citoplasma de hepatócitos foi maior nos animais do grupo 1VitC⁻ (175,0±4,19), em comparação com os animais do Grupo Controle (129,8±0,46). A quantidade deste constituinte tecidual foi maior no grupo 20VitC⁺ (187,4±2,99), quando comparado com o grupo 10VitC⁻ (127,9±0,90), sendo que o grupo 10VitC⁺ (94,9±5,48) apresentou quantidade inferior aos grupos 1VitC⁻ (175,0±4,19) e 20VitC⁻ (152,3±0,43) (Tabela 12).

A quantidade de hepatócitos mononucleares foi maior nos animais dos grupos 1VitC⁻ (38,0±3,63) e 10VitC⁻ (41,2±3,28) em relação ao Grupo Controle (6,1±1,52). Nos grupos 1VitC⁺ (6,1±0,99), 10VitC⁺ (8,2±1,75) e 20VitC⁺ (1,9±0,36) a quantidade deste constituinte tecidual foi inferior aos grupos 1VitC⁻ (38±3,63) e 10VitC⁻ (41,2±3,28). A contagem de hepatócitos binucleados dos grupos 1VitC⁻ (3,0±1,28), 10VitC⁻ (5,4±0,90) e 20VitC⁻ (6,4±1,87) foi similar à verificada no Grupo Controle (3,1±1,71). A quantidade de hepatócitos binucleados foi maior nos animais dos grupos 1VitC⁺ (41,6±4,23), 10VitC⁺ (33,6±4,96) e 20VitC⁺ (53,2±4,44), em comparação com os grupos que não receberam suplementação da vitamina C (Tabela 12).

A presença de infiltrados leucocitários nos animais dos grupos 10VitC⁻ (16,6±1,51) e 20VitC⁻ (19,0±3,47) foi superior em relação ao Grupo Controle (3,9±2,86). Nos grupos 1VitC⁺ (12,3±3,51), 10VitC⁺ (11,3±3,01) e 20VitC⁺ (15,92±1,57), a quantidade deste constituinte tecidual foi similar aos grupos 10VitC⁻ (16,6±1,51) e 20VitC⁻ (19,0±3,47) (Tabela 12).

Os capilares sinusoides dos grupos 1VitC⁻ (18,3±2,14), 10VitC⁻ (23,7±4,56) e 20VitC⁻ (15,2±3,81) apresentaram quantidades superiores às do Grupo Controle (7,9±0,74). Nos grupos 1VitC⁺ (54,9±6,31) e 10VitC⁺ (70,2±7,22), a quantidade deste constituinte tecidual foi superior aos animais dos grupos 1VitC⁻ (18,3±2,14), 10VitC⁻ (23,7±4,56) e 20VitC⁻ (15,2±3,81) (Tabela 12).

Houve aumento significativo do diâmetro nuclear de hepatócitos dos lambaris do grupo 20VitC⁻ (5,1±0,32), quando comparado aos grupos 1VitC⁻ (1,1±0,16), 10VitC⁻ (1,4±0,16) e controle (1,8±0,16). Os grupos 10VitC⁺ (8,2±0,45) e 20VitC⁺ (4,2±0,32) apresentaram aumento do diâmetro nuclear de hepatócitos, quando comparados aos grupos que não receberam a suplementação da vitamina C (Tabela 12).

5.4.3. Análises morfométricas dos testículos

5.4.3.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15

dias: A quantidade de cistos não apresentou diferenças significativas entre os grupos VitC⁻, VitC⁺ e o Controle (Tabela 13).

A quantidade do fluido testicular foi consideravelmente maior nos animais dos grupos 1VitC⁻ (40,3±3,87) e 10VitC⁻ (106,1±4,80) em relação ao Grupo Controle (0,7±0,10). Nos grupos 1VitC⁺ (27,4±1,21), 10VitC⁺ (29,0±5,62) e 20VitC⁺ (54,3±3,14), a quantidade do fluido testicular foi inferior ao grupo 10VitC⁻ (106,1±4,80). Entretanto, a quantidade de espermatozoides dos grupos não apresentou diferenças significativas entre os grupos VitC⁻, VitC⁺ e o Controle (Tabela 13).

A célula de Sertoli foi verificada em maior quantidade nos animais do grupo 1VitC⁻ (13,4±0,38), em comparação com o Grupo Controle (1,2±0,27). No grupo 1VitC⁺ (20,9±1,99), a quantidade desta célula foi superior aos grupos 1VitC⁻ (13,4±0,38), 10VitC⁻ (2,3±0,56) e 20VitC⁻ (1,0±0,86) (Tabela 13).

Em relação às espermatogônias, os animais dos grupos 10VitC⁻ (29,9±4,76) apresentaram a quantidade destas células superior ao Grupo Controle (1,4±0,55). No grupo 20VitC⁺ (39,7±6,68) a quantidade das espermatogônias foi superior aos grupos 1VitC⁻ (1,55±1,26), 10VitC⁻ (29,9±4,76) e 20VitC⁻ (2,0±0,98) (Tabela 13).

5.4.3.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45

dias: A quantidade de cistos dos grupos 1VitC⁻ (39,7±2,27), 10VitC⁻ (39,3±3,12), 20VitC⁻ (24,9±2,01) foi inferior aos animais do Grupo Controle (104,2±4,76). Os grupos 1VitC⁺ (41,4±3,03), 10VitC⁺ (23,5±2,59) e 20VitC⁺ (11,1±2,74) apresentaram quantidade de cistos similar aos grupos que não foram suplementados com a vitamina C. Em contrapartida, a quantidade de intertúbulo foi superior nos testículos dos animais dos grupos: 1VitC⁻ (7,5±1,12), 10VitC⁻ (12,2±2,31), 20VitC⁻ (9,3±1,19) ao comparar com o Grupo Controle (2,2±0,15). Os grupos 1VitC⁺ (52,8±4,25) e 10VitC⁺ (38,2±5,04) apresentaram quantidade do intertúbulo superior a todos os grupos que não receberam vitamina C (Tabela 13).

A quantidade do fluido testicular dos grupos 1VitC⁻ (39,2±6,69), 10VitC⁻ (127,7±4,65) e 20VitC⁻ (135,5±5,57) foram superiores ao Grupo Controle (0,7±1,10). O grupo 20VitC⁺ (182,3±8,33) apresentou a quantidade de fluido testicular superior aos grupos que não foram suplementados com a vitamina C. Em contrapartida, o

número de espermatozoides no grupo 1VitC⁻ (169,8±4,19) foi superior aos grupos 10VitC⁻ (66,6±2,07), 20VitC⁻ (79,3±3,96) e Controle (50,9±2,52). Enquanto isso, a quantidade de espermatozoides nos grupos 1VitC⁺ (59,0±3,54), 10VitC⁺ (73,8±3,02) e 20VitC⁺ (41,6±2,24) foi similar aos grupos que não receberam a suplementação da vitamina C (Tabela 13).

O número de células de Sertoli foi maior nos animais do grupo 1VitC⁻ (8,3±1,59), em comparação com o Grupo Controle (1,2±0,27). A quantidade de células de Sertoli nos grupos 1VitC⁺ (1,9±0,23), 10VitC⁺ (2,6±0,42) e 20VitC⁺ (0,2±0,06) foi similar aos grupos 10VitC⁻ (1,8±0,53) e 20VitC⁻ (0,3±0,48) e inferior ao grupo 1VitC⁻ (8,3±1,59) (Tabela 13).

A quantidade das espermatogônias dos grupos 10VitC⁻ (16,5±1,05) e 20VitC⁻ (16,6±1,05) foi superior ao controle (1,4±0,32). Os grupos 1VitC⁺ (3,8±1,04), 10VitC⁺ (1,8±0,75) e 20VitC⁺ (3,7±1,22) apresentaram quantidade de espermatogônias inferior aos grupos 10VitC⁻ (16,5±6,87) e 20VitC⁻ (16,6±6,06) e similar ao grupo 1VitC⁻ (1,4±0,32) (Tabela 13).

5.5. Análises das enzimas antioxidantes

5.5.1. Estresse oxidativo nas brânquias

5.5.1.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias:

A atividade da enzima SOD no tecido branquial foi menor tanto nos grupos 1VitC⁻ (0,054 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,054 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,025 nmol.g⁻¹) quanto nos grupos 1VitC⁺ (0,092 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,077 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,049 nmol.g⁻¹), quando comparados ao Grupo Controle (0,0118 nmol.g⁻¹). No entanto, o grupo 20VitC⁻ (0,025 nmol.g⁻¹) foi o que apresentou menor atividade de SOD em relação ao Grupo Controle (0,118 nmol.g⁻¹). Ao passo que a atividade dessa enzima foi maior nos grupos 1VitC⁺ (0,092 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,077 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,049 nmol.g⁻¹) em relação aos grupos 1VitC⁻ (0,054 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,054 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,025 nmol.g⁻¹) (Figura 11A).

A atividade da enzima CAT foi superior no tecido branquial dos grupos: 1VitC⁻ (267 µmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (120 µmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (94 µmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (57 µmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (21 µmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (52.500 µmol.min⁻¹.g⁻¹) em comparação com o Grupo Controle (19.500 µmol.min⁻¹.g⁻¹). No entanto, os grupos 1VitC⁻ e 10VitC⁻ apresentaram as maiores atividades desta enzima (267 e 120 µmol.min⁻¹.g⁻¹, respectivamente) em relação ao Grupo Controle (19.500

$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Em contrapartida, os grupos 1VitC⁺ ($57 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁺ ($21 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($52.500 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) apresentaram atividade reduzida da CAT em relação aos grupos 1VitC⁻ ($267 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁻ ($120 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 20VitC⁻ ($94 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) (Figura 11B).

A atividade da GST no tecido branquial dos grupos: 1VitC⁻ ($9.063 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁻ ($4.375 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 20VitC⁻ ($7.917 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 1VitC⁺ ($4.479 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁺ ($2.813 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($4.166 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) foi similar à atividade desta enzima no Grupo Controle ($6.667 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Ao passo que no grupo 1VitC⁻ ($9.063 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), foi verificado maior atividade desta enzima, enquanto o grupo 10VitC⁺ ($2.813 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) apresentou menor atividade da enzima, sempre em relação ao Grupo Controle ($6.667 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Em contrapartida os grupos 1VitC⁻ ($9.063 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁻ ($4.375 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 20VitC⁻ ($7.917 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) apresentaram maior atividade dessa enzima em relação aos respectivos grupos 1VitC⁺ ($4.479 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁺ ($2.813 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($4.166 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) (Figura 12A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior, nos animais dos grupos 1VitC⁻ ($20,6 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10VitC⁻ ($21,5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20VitC⁻ ($20,2 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), em relação ao Grupo Controle ($7,3 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em contrapartida, os grupos 1VitC⁺ ($7,9 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10VitC⁺ ($7,9 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($8,1 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentaram níveis de proteínas carboniladas equivalentes ao Grupo Controle ($7,3 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ao passo que os grupos 1VitC⁻ ($20,6 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10VitC⁻ ($21,5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20VitC⁻ ($20,2 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentaram maiores concentrações dessas proteínas em relação aos grupos 1VitC⁺ ($7,9 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10VitC⁺ ($7,9 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($8,1 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 12B).

5.5.1.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45

dias: A atividade da enzima SOD no tecido branquial, dos grupos: 1VitC⁻ ($0,165 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁻ ($0,152 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁻ ($0,132 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) apresentaram maior atividade desta enzima, em comparação com o Grupo Controle ($0,118 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Porém, os grupos 1VitC⁺ ($0,110 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁺ ($0,103 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁺ ($0,119 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) apresentaram atividade das proteínas carboniladas similares ao Grupo Controle ($0,118 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Ao passo que a atividade dessa enzima foi maior nos grupos 1VitC⁻ ($0,165 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$), 10VitC⁻ ($0,152 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) e 20VitC⁻ ($0,132$

nmol.g⁻¹) em relação aos grupos 1VitC⁺ (0,110 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,103 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,119 nmol.g⁻¹) (Figura 11A).

A atividade da enzima CAT foi superior nos grupos: 1VitC⁻ (275.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (135.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (117.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (78.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (36.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (54.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), em relação ao Grupo Controle (19.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹). No entanto, os grupos 1VitC⁻ (275.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (135.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (117.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentaram maior atividade desta enzima em comparação aos grupos 1VitC⁺ (78.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (36.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (54.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 11B).

A atividade da GST no tecido branquial foi superior nos animais do grupo 1VitC⁻ (14.584 μmol.min.g⁻¹) em relação aos grupos: Controle (6.667 μmol.min.g⁻¹), 10VitC⁻ (4.687 μmol.min.g⁻¹), 20VitC⁻ (8.152 μmol.min.g⁻¹), 1VitC⁺ (5.983 μmol.min.g⁻¹), 10VitC⁺ (2.500 μmol.min.g⁻¹) e 20VitC⁺ (5.135 μmol.min.g⁻¹) (Figura 12A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior nos animais dos grupos: 1VitC⁻ (17,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (12,6 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (15,9 nmol.mL⁻¹) em relação ao Grupo Controle (7,3 nmol.mL⁻¹). Em contrapartida, a quantidade destas proteínas nos grupos: 1VitC⁺ (7,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (6,5 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (8,2 nmol.mL⁻¹) ficou próxima à observada no Grupo Controle (7,3 nmol.mL⁻¹). Enquanto isso, os grupos 1VitC⁺ (7,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (6,5 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (8,2 nmol.mL⁻¹) apresentaram as menores concentrações de proteínas carboniladas em relação aos grupos 1VitC⁻ (17,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (12,6 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (15,9 nmol.mL⁻¹) (Figura 12B).

5.6.2. Estresse oxidativo no fígado

5.5.2.1. Experimento 1 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 15

dias: A atividade da enzima SOD no tecido hepático foi menor nos grupos 1VitC⁻ (0,096 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,057 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,026 nmol.g⁻¹) em relação ao Grupo Controle (0,107 nmol.g⁻¹). Ao passo que nos grupos VitC⁻ esta atividade sofreu redução à medida que a concentração do metal aumentava. Em contrapartida, nos grupos 1VitC⁺ (0,111 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,138 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,086 nmol.g⁻¹), a atividade desta enzima foi equivalente ao Grupo Controle (0,107 nmol.g⁻¹).

¹) e superior aos grupos 1VitC⁻ (0,096 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,057 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,026 nmol.g⁻¹) (Figura 13A).

A atividade da enzima CAT foi maior no tecido hepático dos grupos: 1VitC⁻ (556.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (420.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (592.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (405.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (240.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (555.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) se comparados ao Grupo Controle (132.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹). No grupo 10VitC⁺ (240.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) a atividade desta enzima foi menor em relação aos grupos: 1VitC⁻ (556.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (420.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (592.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (405.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (555.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 13B).

A atividade da GST no tecido hepático foi inferior nos grupos: 1VitC⁻ (15.417 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (17.188 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (15.834 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (19.480 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (26.563 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (22.084 μmol.min⁻¹.g⁻¹) em relação ao Grupo Controle (32.6050 μmol.min.g⁻¹). Os grupos: 1VitC⁺ (19.480 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (26.563 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (22.084 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentaram um leve aumento em relação aos grupos 1VitC⁻ (15.417 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (17.188 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (15.834 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 14A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior nos grupos: 1VitC⁻ (20,5 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (12,1 nmol.mL⁻¹), 20VitC⁻ (10,6 nmol.mL⁻¹), 1VitC⁺ (7,5 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (5,4 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (6,7 nmol.mL⁻¹) em relação ao Grupo Controle (2,7 nmol.mL⁻¹). Porém, nos grupos: 1VitC⁻ (20,5 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (12,1 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (10,6 nmol.mL⁻¹), a quantidade de proteína carbonilada foi maior ao comparar com os grupos 1VitC⁺ (7,5 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (5,4 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (6,7 nmol.mL⁻¹) (Figura 14B).

5.5.2.2. Experimento 2 – Animais expostos ao Cr (VI) durante 45

dias: A atividade da enzima SOD no tecido hepático foi maior nos grupos 1VitC⁻ (0,120 nmol.g⁻¹) e 10VitC⁻ (0,113 nmol.g⁻¹), e menor no grupo 20VitC⁻ (0,087 nmol.g⁻¹) em comparação com o Grupo Controle (0,107 nmol.g⁻¹). Por outro lado, nos grupos 1VitC⁻ (0,120 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,113 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,087 nmol.g⁻¹), esta atividade sofreu redução à medida que a concentração do metal aumentava. Nos grupos 1VitC⁺ (0,127 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,156 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺

(0,102 nmol.g⁻¹) a atividade desta enzima foi maior ou equivalente ao Grupo Controle (0,107 nmol.g⁻¹) e aos respectivos grupos que não receberam vitamina C (Figura 13A).

A atividade da enzima CAT foi maior no tecido hepático dos grupos: 1VitC⁻ (574.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (452.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (600.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (477.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (261.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (433.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) quando comparados ao Grupo Controle (132.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹). Entretanto, nos grupos 1VitC⁺ (477.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (261.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (433.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) a atividade desta enzima foi menor ou similar aos grupos 1VitC⁻ (574.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (452.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 13B).

A atividade da GST no tecido hepático foi inferior nos grupos: 1VitC⁻ (16.676 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (17.677 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (16.909 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (21.055 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (26.772 μmol.min.g⁻¹) e 20VitC⁺ (24.771 μmol.min⁻¹.g⁻¹) em relação ao Grupo Controle (32.6050 μmol.min⁻¹.g⁻¹). Porém, os grupos 1VitC⁺ (21.055 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (26.772 μmol.min.g⁻¹) e 20VitC⁺ (24.771 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentaram um leve aumento em relação aos respectivos grupos 1VitC⁻ (16.676 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (17.677 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (16.909 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 14A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior nos grupos: 1VitC⁻ (17,0 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (15,3 nmol.mL⁻¹), 20VitC⁻ (14,9 nmol.mL⁻¹), 1VitC⁺ (4,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (5,5 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (3,0 nmol.mL⁻¹) em relação ao Grupo Controle (2,7 nmol.mL⁻¹). Porém, nos grupos 1VitC⁺ (4,6 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (5,5 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (3,0 nmol.mL⁻¹) a quantidade de proteína carbonilada foi maior em comparação com os grupos 1VitC⁻ (17,0 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (15,3 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (14,9 nmol.mL⁻¹) (Figura 14B).

5.5.3. Estresse oxidativo no músculo

5.5.3.1. Experimento 1 – Tecido muscular dos animais expostos ao Cr (VI) durante 15 dias: A atividade da enzima SOD no tecido muscular foi inferior nos grupos 1VitC⁻ (0,062 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,051 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,039 nmol.g⁻¹), quando comparados com o Grupo Controle (0,142 nmol.g⁻¹). Enquanto isso, nos grupos 1VitC⁻ (0,062 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,051 nmol.g⁻¹) e

20VitC⁻ (0,039 nmol.g⁻¹) esta atividade sofreu uma redução à medida que a concentração do metal aumentava. Em contrapartida, nos grupos 1VitC⁺ (0,152 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,159 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,165 nmol.g⁻¹), a atividade desta enzima foi substancialmente superior à do Grupo Controle (0,142 nmol.g⁻¹) e dos grupos que não receberam vitamina C (Figura 15A).

A atividade da enzima CAT foi maior no tecido muscular de todos os grupos 1VitC⁻ (33.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (61.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (35.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), quando comparados ao Grupo Controle (21.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹). Os grupos 1VitC⁻ (33.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (61.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (35.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentaram maior atividade da enzima CAT em relação ao Grupo Controle (21.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e aos grupos que receberam vitamina C: 1VitC⁺ (12.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (19.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (11.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 15B).

A atividade da GST no tecido muscular foi inferior em todos os grupos VitC⁻ e VitC⁺, exceto pelo grupo 20VitC⁺ (2.117 μmol.min⁻¹.g⁻¹), cuja atividade foi superior, sempre em comparação ao Grupo Controle (2.083 μmol.min.g⁻¹). Os grupos 1VitC⁺ (833 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 10VitC⁺ (417 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentaram atividade reduzida desta enzima em relação aos grupos 1VitC⁻ (1.042 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (1.875 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (1.667 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 16A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior nos grupos: 1VitC⁻ (19,1 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (16,9 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (17,5 nmol.mL⁻¹) em relação ao Grupo Controle (7,1 nmol.mL⁻¹), e aos grupos: 1VitC⁺ (7,2 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (8,5 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (8,8 nmol.mL⁻¹) (Figura 16B).

5.5.3.2. Experimento 2 – Tecido muscular de animais expostos ao Cr (VI) durante 45 dias: A atividade da enzima SOD no tecido muscular foi inferior nos grupos 1VitC⁻ (0,051 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,042 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,030 nmol.g⁻¹) quando comparados com o Grupo Controle (0,142 nmol.g⁻¹). Enquanto isso, nos grupos 1VitC⁻ (0,051 nmol.g⁻¹), 10VitC⁻ (0,042 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁻ (0,030 nmol.g⁻¹), esta atividade sofreu uma redução à medida que a concentração do metal aumentava. Em contrapartida, nos grupos 1VitC⁺ (0,165 nmol.g⁻¹), 10VitC⁺ (0,176 nmol.g⁻¹) e 20VitC⁺ (0,190 nmol.g⁻¹), além da atividade desta enzima ter aumentado de acordo com o aumento da concentração do metal, ela

foi substancialmente maior em relação ao Grupo Controle (0,142 nmol.g⁻¹) (Figura 15A).

A atividade da enzima CAT foi maior no tecido muscular nos grupos 1VitC⁻ (40.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (66.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (41.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), quando comparada à do Grupo Controle (21.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹). Em contrapartida, nos grupos: 1VitC⁺ (15.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (25.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (22.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) a atividade desta enzima foi equivalente ao Grupo Controle (21.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹). No entanto a atividade dessa enzima nos grupos 1VitC⁺ (15.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁺ (25.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (22.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹) foi menor em relação aos grupos 1VitC⁻ (40.500 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 10VitC⁻ (66.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁻ (41.000 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 15B).

A atividade da GST no tecido muscular foi inferior nos grupos: 1VitC⁻ (729 μmol.min.g⁻¹), 10VitC⁻ (1.120 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (854 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (544 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 10VitC⁺ (324 μmol.min⁻¹.g⁻¹) sempre em comparação com o Grupo Controle (2.083 μmol.min.g⁻¹). Ao passo que no grupo 20VitC⁺ (2.229 μmol.min⁻¹.g⁻¹), a atividade da GST foi equivalente ao Grupo Controle (2.083 μmol.min.g⁻¹) e inferior aos demais grupos VitC⁻ e VitC⁺. Porém, o grupo: 10VitC⁺ (324 μmol.min⁻¹.g⁻¹) apresentou a menor atividade desta enzima em relação aos grupos 1VitC⁻ (729 μmol.min.g⁻¹), 10VitC⁻ (1.120 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 20VitC⁻ (854 μmol.min⁻¹.g⁻¹), 1VitC⁺ (544 μmol.min⁻¹.g⁻¹) e 20VitC⁺ (2.229 μmol.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 16A).

A concentração de proteínas carboniladas foi maior nos grupos 1VitC⁻ (16,7 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁻ (17,9 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁻ (17,1 nmol.mL⁻¹), quando comparada à encontrada no Grupo Controle (7,1 nmol.mL⁻¹) e nos grupos: 1VitC⁺ (7,8 nmol.mL⁻¹), 10VitC⁺ (8,1 nmol.mL⁻¹) e 20VitC⁺ (6,6 nmol.mL⁻¹) (Figura 16B).

5.6. Bioissorção e *Cocos nucifera L.*

Em relação ao uso do pó da casca de coco verde como material bioissorvente, verificou-se que a solução 3, contendo 20 mg.L⁻¹ de Cr (VI) e 5 g.L⁻¹ de material bioissorvente, apresentou as maiores porcentagens de bioissorção do metal em 60 min de agitação (74,96 %) e em 120 min de agitação (75,75 %), comparando-se com as demais concentrações testadas (Figura 17).

6. DISCUSSÃO

6.1. Mortalidade e Comportamento animal

Alterações de comportamento e mortalidade em peixes expostos ao Cr e a outros metais pesados têm sido observadas em diversos estudos (Brown e Ahsanullah, 1971; Hodson, 1988; Olojo et al., 2005; Condessa, 2009; Santos, 2010). No presente estudo, foram observados: natação descoordenada, intenso batimento opercular, letargia e morte nos animais expostos à maior dose (20 mg.L^{-1}) de Cr (VI). Resultados similares foram verificados em *Oncorhynchus mykiss* expostos a concentrações subcrônicas (30 dias) de 3 e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Hollis et al., 1999), em *Channa punctatus* expostos a concentrações agudas (96h) de 20 e 40 mg.L^{-1} de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), adicionados à água (Mishra e Mohanty, 2008) e em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a concentrações subcrônicas (30 dias) de 10, 15 e 20 mg.L^{-1} de zinco (Zn), adicionados à água (Condessa, 2009).

6.2. Determinação da concentração de Cr nos tecidos

Dos tecidos avaliados neste estudo, quanto à concentração de Cr, as brânquias, fígado e intestino, tanto dos animais dos grupos VitC⁻ quanto dos grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2, apresentaram os maiores níveis de acumulação do metal. No entanto, a concentração deste metal nos tecidos dos animais do experimento 1 (15 dias) foi inferior às concentrações vistas nos animais do experimento 2 (45 dias), tanto nos peixes que não receberam a suplementação com a vitamina quanto nos peixes que receberam a suplementação com a vitamina C. Depois de adsorvido, o Cr (VI) é transportado pelo sangue para vários tecidos, penetra rapidamente nos eritrócitos (Kiilunem, 1994), acumulando, principalmente, em fígado, rins e baço (WHO, 1996). As diferenças nos níveis de acumulação de metal nos diferentes órgãos dos peixes podem, primariamente, ser atribuídas às diferenças no papel fisiológico de cada órgão (Karuppasamy, 2004) e, conseqüentemente, à capacidade de tolerância e às diversas funções regulatórias que podem influenciar nas diferenças da acumulação nos tecidos (Romanenko et al., 1986). Resultados similares quanto à relação tempo de exposição vs. concentração do metal foram observados em *Cirrhinus mrigala* expostos a $10,83 \text{ mg.L}^{-1}$ de níquel (NiCl_2), $18,20 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e um mix contendo $8,61 \text{ mg.L}^{-1}$ de NiCl_2

e $K_2Cr_2O_7$, durante 7, 14, 21 e 28 dias (Palaniappan e Karthikeyan, 2008). Há relatos de acumulações expressivas em brânquias e rins de indivíduos *Oncorhynchus tshawytscha* expostos a 24 e 54 $\mu g.L^{-1}$ de Cr durante 105 e 134 dias (Frag et al., 2006) e em fígado e rins de *Cirrhinus mrigala* expostos a 10,83 $mg.L^{-1}$ de níquel ($NiCl_2$), 18,20 $mg.L^{-1}$ de cromo ($K_2Cr_2O_7$) e um mix contendo 8,61 $mg.L^{-1}$ de $NiCl_2$ e $K_2Cr_2O_7$, durante 7, 14, 21 e 28 dias (Palaniappan e Karthikeyan, 2008). Alguns estudos detectaram concentrações de Cr nas brânquias ($0,3 mg.Kg^{-1}$) e fígado ($0,11 mg.Kg^{-1}$) de indivíduos de *Silurus glanis* coletados em rios da Itália (Squadrone et al., 2013); e em brânquias ($8,06 \pm 0,14$, $1,88 \pm 0,78$, $9,53 \pm 2,67$ e $0,04 \pm 0,003 mg.Kg^{-1}$), fígado ($7,98 \pm 0,21$, $3,25 \pm 1,72$, $4,17 \pm 3,12$ e $0,04 \pm 0,007 mg.Kg^{-1}$), rins ($8,06 \pm 0,10$, $2,57 \pm 0,65$, $0,45 \pm 0,15$ e $0,04 \pm 0,004 mg.Kg^{-1}$) e músculo ($7,66 \pm 0,13$, $0,43 \pm 0,09$, $0,40 \pm 0,10$, $0,04 \pm 0,005 mg.Kg^{-1}$) de *Capoeta trutta* coletados em lagos da Turquia (Danabas e Ural, 2012).

6.3. Análises histopatológicas das brânquias, fígado e testículos

6.3.1. Análises histopatológicas das brânquias

As brânquias dos Teleósteos participam de muitas funções importantes, como respiração, osmorregulação e excreção, se encontram em contato direto com o ambiente externo e são extremamente sensíveis a alterações na qualidade da água. Por isso, são consideradas o principal alvo de poluentes (Polëksic e Mitrovic-Tutundžic, 1994; Mazon et al., 2002; Fernandes e Mazon, 2003). Portanto, a análise de histopatologias branquiais, induzidas pela exposição de teleósteos a metais pesados, é de suma importância em estudos toxicológicos (Thophon et al., 2003).

Alterações como a dilatação dos canais vasculares podem ocorrer quando os peixes sofrem estresse por intoxicantes. No presente estudo, os grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 1 e os grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 2 apresentaram porcentagens similares dessa alteração. No entanto, os grupos VitC⁺ de ambos os experimentos apresentaram porcentagens superiores da dilatação dos canais vasculares em relação aos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2. Indicando que o tempo de exposição ao metal não agravou a presença dessas patologias e que as dosagens da vitamina C adicionadas à ração, ao longo dos 15 e 45 dias de experimento, não foram suficientes para proteger o organismo dos lambaris da lesão, citada acima, que foi causada pela exposição ao Cr. Segundo alguns pesquisadores, os danos às células de pilar, causados pela exposição ao metal, podem ter aumentado

o fluxo sanguíneo para dentro das lamelas, provocando, assim, a dilatação do seio venoso, congestão sanguínea e aneurismas (Takashima e Hibiya, 1995; Rosety-Rodríguez et al., 2002). Resultados similares foram observados em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 25 mg.L⁻¹ de cádmio (CdCl₂) durante 4 dias (Garcia-Santos et al., 2007) e em *Oreochromis niloticus* coletados em ambientes poluídos da Arábia Saudita (Abdel-Moneim et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados, a deformação das lamelas primárias dos grupos VitC⁻ do experimento 2 se apresentaram em porcentagens mais elevadas em relação aos grupos VitC⁻ do experimento 1. Os grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2 apresentaram porcentagens similares da alteração em questão. Além disso, nos grupos de animais que receberam a suplementação com a vitamina C, de ambos os experimentos, foram observadas porcentagens superiores aos grupos que não receberam a suplementação com a vitamina C, de ambos os experimentos. Sugerindo-se que a suplementação dessa vitamina não apresentou efeito protetor para a deformação das lamelas primárias, comprometendo, assim, as funções vitais das brânquias, como as trocas gasosas e a osmorregulação. Estas alterações foram também verificadas nas brânquias de indivíduos de *Hypophthalmichthys molitrix* expostos a 5,7 mg.L⁻¹ de níquel adicionado à água durante 30 dias (Athikesavan et al., 2006) e em indivíduos de *Tilapia mossambica* e *Lates calcarifer* expostos a 2,8 ppm de mercúrio e cromo adicionados à água por 28 dias (Dwivedi et al., 2012).

As seguintes alterações patológicas: hiperplasia e hipertrofia do epitélio, fusão e desorganização da lamela secundária e descamação do epitélio filamentar, foram observadas, neste estudo, em elevadas porcentagens nos grupos do experimento 2, em relação aos grupos do experimento 1, que não receberam a suplementação com a vitamina C. Os grupos do experimento 1, que receberam a suplementação com a vitamina C, apresentaram porcentagens similares aos grupos do experimento 2, que receberam a suplementação com a vitamina C das alterações citadas acima. Sendo que, nos grupos VitC⁻ observou-se que as porcentagens dessas patologias foram inferiores aos grupos VitC⁺ de ambos os períodos experimentais (15 e 45 dias). As patologias supracitadas são consideradas, por vários pesquisadores, como exemplos de mecanismos de defesa do animal contra o agente poluidor, uma vez que, em geral, estas resultam no aumento da distância entre o ambiente externo e o sangue, formando assim, uma barreira contra a entrada de contaminantes e também diminuindo a área de superfície vulnerável das brânquias (Mallatt, 1985; Karlsson-

Norrgrén et al, 1985; Hinton e Laurén, 1990; Erkmen e Kolankaya, 2000; Fernandes e Mazon, 2003). Esses mecanismos dificultam o acesso do poluente ao sangue, no entanto, as trocas gasosas também são prejudicadas (Fernandes e Mazon, 2003; McDonald e Wood, 2003). Na tentativa de se defender contra os poluentes ambientais, as alterações mencionadas podem acabar sendo maléficas aos peixes, pois as dificuldades respiratórias e a tentativa de aumentar a taxa de ventilação para compensar a baixa captação de oxigênio, podem levar à vasodilatação. Sendo que a presença da vasodilatação pode desencadear uma série de eventos que podem acarretar em outras alterações patológicas, e o conjunto de todas essas alterações pode ocasionar, conseqüentemente, a morte dos peixes. Alterações similares foram observadas por Mokhtar e Abd-Elhafeez (2013) em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L⁻¹ de acetato de chumbo por 3 semanas. Korkmaz et al. (2009) observaram a redução de hipertrofia, proliferação do epitélio filamentar e fusão de lamelas secundárias no período recuperativo de 15 dias com ração suplementada com vitamina C, em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de cipermetrina associada ou não a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de vitamina C durante 10 e 20 dias.

De acordo com resultados apresentados, as porcentagens da hipertrofia e hiperplasia das células de cloro e das células mucosas observadas nos grupos VitC⁻ e VitC⁺, do experimento 1, foram similares aos grupos VitC⁻ e VitC⁺, do experimento 2. De forma que, os grupos VitC⁺ de ambos os períodos experimentais apresentaram maiores porcentagens, das alterações supracitadas, que os grupos VitC⁻ de ambos os períodos experimentais. Sugerindo que o tempo de exposição ao Cr não alterou a presença dessas alterações e que a suplementação da vitamina C não promoveu o efeito protetor esperado nas brânquias dos animais que receberam a vitamina. A hipertrofia das células de cloro é considerada uma resposta ao estresse causado pela exposição ao metal (Nero et al., 2006). Na mesma linha, esta hipertrofia pode ser considerada um mecanismo de defesa dos peixes, já que o muco é constituído por uma diversidade de açúcares e proteínas que atraem as substâncias tóxicas, reduzindo, portanto, a entrada de poluentes através das brânquias (Perry e Laurente, 1989). No entanto, a hipersecreção de muco pode resultar em cobertura cada vez maior do epitélio branquial, impedindo, assim, as trocas gasosas (Pawert et al., 1998). Estas alterações foram verificadas por Maggioni et al. (2012) em diversas espécies de peixes coletadas em ambientes poluídos da Argentina. Barillet et al. (2010) observaram hipertrofia de células mucosas em indivíduos de *Danio rerio*

expostos a 93,35 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de urânio ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), adicionado à água, durante 20 dias. Dwivedi et al., (2012), bem como Mokhtar e Abd-Elhafeez (2013), verificaram a presença de proliferação e hipertrofia das células de cloro em indivíduos de *Tilapia mossambica* e *Lates calcarifer* expostos a 2,8 ppm de mercúrio e cromo por 28 dias, adicionados na água, e também em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L^{-1} de acetato de chumbo por 3 semanas, respectivamente.

A necrose e a ruptura celular são patologias associadas às alterações que refletem o efeito direto dos poluentes (Temminck et al., 1983) e ocorrem com maior frequência em condições de elevada toxicidade (Abel et al., 1976). No presente estudo, os animais dos grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 1 apresentaram porcentagens inferiores aos grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 2. Uma vez que, em ambos os períodos experimentais, os grupos VitC⁺ apresentaram porcentagens, dessas lesões, superiores aos grupos VitC⁻. Isto indica que a vitamina C não foi capaz de surtir efeito protetor para essas lesões. Abdel-Moneim et al. (2012) observaram rupturas celulares nas brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em ambientes poluídos, inclusive com o Cr, na Arábia Saudita. Garcia-Santos et al., (2007) verificaram necrose e ruptura de células em *Oreochromis niloticus* expostos a 25 mg.L^{-1} de cádmio (CdCl_2) durante 4 dias. Rupturas celulares foram observadas por Camargo e Martinez (2007) em *Prochilodus lineatus* coletados nos córregos Apertados e Cambé, situados na cidade de Londrina no Paraná, e por Mokhtar e Abd-Elhafeez (2013) em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L^{-1} de acetato de chumbo por 3 semanas, respectivamente. Parvathi et al., (2011) e Dwivedi et al., (2012) também verificaram a presença de necrose em indivíduos de *Tilapia mossambica* e *Lates calcarifer* expostos a 2,8 ppm de mercúrio e cromo adicionados à água por 28 dias, e também em *Cyprinus carpio* após exposição a dose letal de cromo durante 96 h, respectivamente. Korkmaz et al. (2009) observaram que indivíduos de *Oreochromis niloticus* apresentaram redução de aneurismas ao serem alimentados com ração e vitamina C durante 15 dias, após exposição a 0,22 e 0,44 g L^{-1} de cipermetrina associada ou não a 0,22 e 0,44 g L^{-1} de vitamina C durante 10 e 20 dias.

No presente estudo, a presença de aneurismas nos animais dos grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 1 foi inferior aos grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 2. Uma vez que, em ambos os períodos experimentais, os grupos VitC⁺ apresentaram porcentagens, dessa alteração, superiores aos grupos VitC⁻. Apontando que a

dosagem de vitamina C ofertada aos animais não foi suficiente para proteger o órgão contra o potencial efeito tóxico do Cr. Esta alteração pode estar relacionada com a ruptura das células de pilar (Martinez et al., 2004), devido ao maior fluxo de sangue nas lamelas ou efeito direto do metal sobre as lamelas. Este tipo de alteração patológica é considerado grave e a sua recuperação é possível, mas é mais difícil do que as alterações epiteliais (Polëksic e Mitrovic-Tutundžic, 1994). Camargo e Martinez (2007) observaram esta patologia em *Prochilodus lineatus* coletados nos córregos Apertados e Cambé, situados na cidade de Londrina no Paraná. Maggioni et al., (2012) observaram aneurismas lamelares em diversas espécies de peixes coletadas em ambientes poluídos da Argentina. Mishra e Mohanty, (2008) observaram aneurismas em indivíduos de *Channa punctatus* expostos por 96 h as concentrações de 20 e 40 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) adicionado à água.

A metodologia índice de alteração histopatológica (IAH) estipulou as severidades das lesões branquiais observadas nos animais expostos ao Cr. De acordo com os resultados obtidos, neste estudo, mesmo constatando uma quantidade considerável de patologias classificadas como pertencentes ao estágio III (severas), no geral, os valores médios do IAH branquial indicou a ocorrência de alterações patológicas leves em todos os grupos expostos ao Cr, independente do tempo de exposição e da dieta oferecida. Essa classificação indica que as alterações patológicas não afetam a funcionalidade do órgão. Camargo e Martinez (2007) encontraram em *Prochilodus lineatus* coletados nos córregos Apertados e Cambé, situados na cidade de Londrina no Paraná, valores de IAH variando entre 3,6 e 13,2, indicativos de possibilidade de funcionamento normal do órgão. Alterações consideradas moderadas foram relatadas por Flores-Lopes e Thomaz (2011) em espécimes de *Astyanax fasciatus* (IAH=41,67) e *Cyanocharax alburnos* (IAH=35,69) coletados em ambientes poluídos (rios Caí, Gravataí, Jacuí e Sinos).

Pelo meio da metodologia Valor Médio da Alteração (VMA), foi possível calcular o grau de ocorrência de histopatologias, por animal, nas brânquias de animais expostos a diferentes concentrações de Cr e foi constatado que o tempo de exposição ao metal e a suplementação com a vitamina C não interferiu expressivamente no grau da ocorrência das lesões histológicas estudadas.

6.3.2. Análises histopatológicas do fígado

O fígado é um dos primeiros órgãos a entrar em contato com poluentes após eles terem atingido a corrente sanguínea (van der Oost et al., 2003), por isso está sujeito a sofrer inúmeras alterações patológicas, como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos capilares sinusoides e formação de neoplasmas. Estas alterações podem ser interpretadas como respostas ao estresse ambiental sendo, desta forma, consideradas como indicadores histopatológicos (bioindicadores) da qualidade do ambiente (Teh et al., 1997).

A vacuolização dos hepatócitos pode ser resultante de um desequilíbrio entre a taxa de síntese de substâncias nestas células e a taxa da liberação destas mesmas substâncias para o sangue. Este desequilíbrio pode levar à degeneração celular, a qual se caracteriza pela degradação de proteínas estruturais na membrana das células, podendo levar à necrose, já que as proteínas estruturais de membrana mantêm o tecido hepático compacto e homogêneo (Pacheco e Santos, 2002). No presente estudo, este tipo de alteração hepática foi pronunciado em todos os grupos que foram expostos ao Cr (VI). Ao passo que os grupos VitC⁻ e VitC⁺, do experimento 1, apresentaram porcentagens similares aos grupos VitC⁻ e VitC⁺, do experimento 2. Porém os grupos VitC⁺, dos experimentos 1 e 2, apresentaram maiores porcentagens dessa alteração patológica do que os grupos VitC⁻, dos experimentos 1 e 2, sugerindo que a vitamina C não protegeu contra esta lesão. Korkmaz et al. (2009) também observaram vacuolização no período recuperativo de 15 dias com ração suplementada com vitamina C, de indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de cipermetrina associada ou não a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de vitamina C durante 10 e 20 dias, ou seja, a vitamina C também não teve efeito protetor para esta lesão hepática. A mesma alteração foi observada em indivíduos de *Oreochromis* spp. expostos por 24 e 96 h à concentração de 43,7 mg.L⁻¹ de Cr (VI) adicionado à água (Abbas e Ali, 2007); em *Channa punctatus* após exposição por 96 h a concentrações de 20 e 40 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) adicionado à água (Mishra e Mohanty, 2008); em *Carassius auratus* expostos por 96 h a concentrações de 21,42, 42,85 e 85,70 mg.L⁻¹ de Cr (VI) adicionado à água (Velma e Tchounwou, 2010); e em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L⁻¹ de acetato de chumbo, durante 3 semanas (Mokhtar e Abd-Elhafeez, 2013).

A presença de infiltrados leucocitários e núcleos picnóticos de hepatócitos, constatada neste estudo, apresentou reduções em suas porcentagens nos grupos VitC⁺

(experimentos 1 e 2) quando comparados aos grupos VitC⁻ (experimentos 1 e 2). Sugerindo, portanto, que as dosagens da vitamina C ofertadas aos lambaris, ao longo dos períodos experimentais, demonstraram se suficientes para iniciar a ação protetora da vitamina sob essas lesões citadas acima. A presença destas alterações patológicas indica que há necrose no tecido hepático, portanto, podem-se associar estas alterações patológicas com a hepatotoxicidade induzida pela exposição ao metal pesado (Gabriel et al., 2007). De forma que a necrose do tecido hepático se caracteriza por alterações nucleares e citoplasmáticas, seguidas de perda dos limites celulares (Roberts, 1989). Ao ocorrer necrose em um determinado tecido, há a liberação de moléculas sinalizadoras que induzem proliferação celular para a substituição das células mortas, com a finalidade de retornar às condições normais do tecido (Roberts, 1989). Este tipo de lesão leva a prejuízos estruturais e funcionais no fígado de peixes (Stentiford et al., 2003), diminuindo sua funcionalidade, e podendo levar à falência do órgão (Rabitto et al., 2005). A necrose está fortemente associada ao estresse oxidativo, uma vez que a peroxidação lipídica é originária da bicamada lipídica de uma membrana suscetível a agentes tóxicos. Com a intoxicação, ocorre o aumento de radicais livres no citoplasma das células, ocasionando a elevação das taxas de necrose e apoptose celular (Avci et al., 2005). A presença de infiltrados leucocitários e núcleos picnóticos de hepatócitos foi observada em indivíduos de *Channa punctatus* expostos por 96 h a concentrações de 20 e 40 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) adicionado à água (Mishra e Mohanty, 2008); também em *Carassius auratus* após exposição por 96 h a concentrações de 21,42, 42,85 e 85,70 mg.L⁻¹ de Cr (VI) (Velma e Tchounwou, 2010). Núcleos picnóticos foram observados em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L⁻¹ de acetato de chumbo durante 3 semanas (Mokhtar e Abd-Elhafeez, 2013); e em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de cipermetrina associada ou não a 0,22 e 0,44 g.L⁻¹ de vitamina C durante 10 e 20 dias (Korkmaz et al., 2009). A necrose foi relatada em *Cyprinus carpio* após exposição à dose letal de cromo durante 96 h (Parvathi et al., 2011); e em *Oreochromis niloticus* coletados em ambientes poluídos da Arábia Saudita (Abdel-Moneim et al., 2012). Abbas e Ali (2007) relataram degradação e necrose de hepatócitos e da veia central em *Oreochromis* spp. Expostos por 24 e 96 h à concentração de 43,7 mg.L⁻¹ de Cr (VI) adicionado à água.

Lesões como desarranjo da estrutura do parênquima, necrose e degeneração de hepatócitos são frequentemente associadas à poluição do ambiente aquático

(Athikesavan et al., 2006; Abba e Ali, 2007; Mishra e Mohanty, 2008). Estas lesões foram observadas no presente estudo nos grupos expostos ao Cr (VI), independentemente da suplementação com vitamina C, sendo que a ocorrência destas lesões está decisivamente relacionada à presença de Cr na água, visto que nenhuma alteração foi observada no Grupo Controle. A perda do arranjo estrutural do parênquima foi observada em *Hypophthalmichthys molitrix* expostos durante 30 dias a 5,7 mg.L⁻¹ de níquel adicionado à água (Athikesavan et al., 2006); e em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,4 e 0,7 mg.L⁻¹ de acetato de chumbo durante 3 semanas (Mokhtar e Abd-Elhafeez, 2013). A degeneração no parênquima hepático foi observada em *Oreochromis niloticus* coletados em ambientes poluídos da Arábia Saudita (Abdel-Moneim et al., 2012); e em *Cyprinus carpio* após exposição à dose letal de cromo durante 96 h (Parvathi et al, 2011).

O método Índice de Alteração Histopatológica (IAH) é baseado na severidade das lesões. Neste estudo, os valores médios do IAH hepático indicou a ocorrência de alterações patológicas leves, em todos os grupos expostos ao Cr, independente do tempo de exposição e da dieta oferecida. Inferindo, assim, que o tempo de exposição e a suplementação da dieta com a vitamina C não agravaram ou amortizaram o índice de alterações histológicas (IAH). Segundo Camargo e Martinez (2007), o IAH hepático foi 52, em *Prochilodus lineatus* coletados nos córregos Apertados e Cambé, situados na cidade de Londrina no Paraná, o que indica alterações severas no órgão.

O valor médio de alteração (VMA), que é baseado na ocorrência de lesões por animal, não se apresentou alterado, neste estudo, ao comparar os grupos dos diferentes períodos (15 e 45 dias) de exposição ao Cr e os grupos que receberam ou não a suplementação com a vitamina C. Inferindo, no geral, que o tempo de exposição não agravou a ocorrência das histopatologias estudadas e que a suplementação com a vitamina C não surtiu o efeito protetor, esperado, no tecido hepático contra os efeitos tóxicos do Cr.

6.3.3. Análises histopatológicas dos testículos

Os peixes estão susceptíveis a constantes exposições a vários tipos de poluentes ambientais, os quais, por sua vez, podem ser absorvidos e transportados até às gônadas. Os efeitos desses poluentes ambientais sobre a reprodução desses animais são aparentemente rápidos. Por isso, a análise histopatológica das gônadas de teleósteos expostos a metais pesados é de suma importância em estudos

toxicológicos (Christiansen et al., 1998; Miles-Richardson et al., 1999; van den Belt et al., 2002; Kinnberg e Toft, 2003; van der Ven et al., 2003).

Há relatos da inibição do processo espermatogênico, com número aumentado de espermatogônias/espermatócitos e reduzido de espermatozoides/espermátides, a atrofia e/ou necrose das células intersticiais bem como mudanças na estrutura das células de sustentação, como sendo as alterações testiculares mais comumente observadas em peixes expostos a metais pesados (Creasy, 1997).

A vacuolização, em estágio avançado, pode levar as células germinativas à necrose. Foi observada no presente estudo uma considerável redução da ocorrência da vacuolização nos grupos VitC⁺ em relação aos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2, sugerindo a eficácia do efeito protetor da vitamina C sobre o tecido testicular dos animais que a receberam. Vacuolizações nas células de Leydig foram observadas ao estudar os efeitos da poluição ambiental sobre as gônadas de indivíduos de *Puntius Javanicus* na Indonésia (Shobikhuliatul et al., 2013).

As células germinativas em desenvolvimento, especialmente os espermatócitos primários e secundários, foram afetadas negativamente pelo Cr (VI) no presente estudo, ocasionando o retardo no desenvolvimento gonadal, com a ocorrência de agrupamentos pronunciados de células germinativas, picnose nuclear, e degeneração de cistos. Foram verificadas quantidades reduzidas de agrupamentos nucleares e picnose nuclear nos grupos VitC⁺, dos experimentos 1 e 2, em relação aos grupos VitC⁻, dos experimentos 1 e 2, sugerindo, mais uma vez, que a suplementação com a vitamina C atuou como protetora contra os efeitos tóxicos do Cr (VI), ao reduzir a frequência destas patologias. A picnose nuclear é caracterizada por arredondamento e condensação do núcleo celular, podendo causar alterações genéticas, necrose e, conseqüentemente, implica na redução do número de espermatozoides (Pieterse, 2004). As alterações supracitadas são comumente observadas em espécies de peixes expostos a outras substâncias em níveis tóxicos, conforme relatado por Nath e Kumar (1990) em indivíduos de *Colisa fasciatus* expostos ao sulfato de níquel (64 mg.L⁻¹), adicionado à água, por apenas 24h. Sendo que Pieterse (2004) verificou a presença de picnose em *Oreochromis mossambicus* após exposição a 0,16, 0,4 e 2,0 mg.L⁻¹ de cobre durante 96 h. Enquanto isso, Vergílio et al. (2013) observaram a presença de fusões nucleares e redução de células germinativas em indivíduos de *Gymnotus carapo* expostos a 5, 10, 20 e 30 µM de mercúrio durante 24, 48, 72 e 96 h. Adicionalmente, Shobikhuliatul et al. (2013), ao

estudarem os efeitos da poluição ambiental, na Indonésia, observaram degeneração de cistos e necrose em indivíduos de *Puntius javanicus*.

Necroses e degenerações císticas, identificadas no presente estudo, em menor porcentagem nos grupos VitC⁺ (experimentos 1 e 2), pode ser reflexo do efeito protetor da vitamina C contra a intoxicação do Cr (VI) no tecido. Essas alterações foram observadas em maior porcentagem nos grupos VitC⁻ (do experimento 2) em relação aos grupos VitC⁺ (do experimento 1). Além de resultar em alterações degenerativas no epitélio seminífero, esta patologia também pode ser responsável por mudanças nas células espermatogênicas (Pieterse, 2004). A perda da estrutura de cistos é comum em espécies de peixes expostas a outros metais em níveis tóxicos, conforme relatado por Nath e Kumar (1990) em indivíduos de *Colisa fasciatus* expostos ao sulfato de níquel (64 mg.L⁻¹), adicionado à água por 24 h. Sendo que Pieterse (2004) verificou a presença desta alteração em *Oreochromis mossambicus* após exposição a 0,16, 0,4 e 2,0 mg.L⁻¹ de cobre durante 96 h, o mesmo ocorrendo em indivíduos de *Gymnotus carapo* expostos a 5, 10, 20 e 30 µM de mercúrio durante 24, 48, 72 e 96 h (Vergilio et al., 2013).

De acordo com Ham e colaboradores (1997), e Badre e Kumar (1987), as substâncias tóxicas parecem atuar indiretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos e esteroides, o que impacta a diferenciação, a maturação, a morfologia e a fisiologia gonadal como um todo, podendo, portanto, influenciar diretamente as divisões celulares do tecido germinativo.

A metodologia utilizada para caracterizar as severidades das lesões – índice de alteração histopatológica (IAH) – constatou que os valores médios do IAH testicular obtidos, neste estudo, foram classificados como moderadas nos grupos 20VitC⁺ expostos ao metal por 15 e 45 dias, ou seja, afetam parcialmente a função do tecido, e leves nos demais grupos expostos ao Cr por 15 e 45 dias, independentemente da dieta oferecida, não comprometendo, assim, a função do tecido hepático.

O valor médio da alteração (VMA) testicular pode-se observar que em algumas patologias o tempo de exposição ao metal interferiu no grau de ocorrência de algumas lesões, como por exemplo, a ruptura de cistos apresentou aumento nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ expostos ao Cr por 45 em relação ao grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ expostos ao metal por 15 dias. Por outro lado, a ruptura de cistos foi classificada como não observada em todos os grupos VitC⁺ do experimento 2

enquanto que nos grupos 1VitC⁺ e 20VitC⁺ do experimento 1 essa alteração foi classificada como discreta e moderada, respectivamente. Portanto, infere-se que o tempo de exposição ao Cr (VI) e a presença da suplementação da vitamina C podem influenciar na gravidade das ocorrências de algumas lesões testiculares.

6.4. Análises morfométricas das brânquias, fígado e testículos

6.4.1. Análises morfométricas das brânquias

A análise morfométrica de histopatologias nas brânquias permite avaliar de forma direta a relação do peixe com o ambiente aquático onde vive (Silva, 2004). Como regra geral, espera-se que a área das lamelas seja maior em condições favoráveis à sobrevivência dos animais, e menor quando estes vivem em um ambiente menos favorável (Maciel Junior, 2006). Esta propriedade das brânquias em alterar a área de lamela em resposta às condições ambientais tem sido utilizada em vários estudos com objetivo de avaliar a toxicidade de poluentes sobre as células dos peixes (Leonardo et al., 2001; Silva, 2004; Figueiredo-Fernandes et al. 2007, Garcia-Santos et al. 2007, Reis et al., 2009).

No presente estudo, o aumento no número de células mucosas em todo o filamento branquial observado em animais dos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻ expostos ao metal durante 15 e 45 dias, quando comparado ao Grupo Controle, indica que a exposição ao metal pode causar a proliferação dessas células. Observou-se, também, que, no geral, não houve diferença significativa entre os grupos VitC⁻, 1VitC⁺ e 20VitC⁺, expostos ao metal por 15 dias, e os respectivos grupos VitC⁻, 1VitC⁺ e 20VitC⁺, expostos ao metal por 45 dias. Além disso, os grupos VitC⁺, expostos ao metal durante 15 e 45 dias, não apresentaram diferença estatística entre os respectivos grupos VitC⁻, expostos ao metal durante 15 e 45 dias. Sugerindo, portanto, que a vitamina C fornecida não atuou como agente protetor contra o efeito nocivo do Cr às células mucosas. Sabe-se que a proliferação e a hipersecreção das células mucosas nas brânquias frente a situações de estresse podem ser consideradas como mecanismos de defesa numa resposta crônica, mas que podem, no entanto, comprometer a função branquial, dependendo da severidade do processo (Mallatt, 1985; Leonardo et al., 2001; Fracácio et al., 2003).

O aumento e redução no número das células de pilar observadas nos animais expostos ao Cr durante 15 e 45 dias, alimentados ou não com ração suplementada com a vitamina C, podem ser em decorrência do aumento de fluxo sanguíneo nas

lamelas, já que as células de pilar fornecem suporte junto aos vasos sanguíneos (Takashima e Hibiya, 1995; Rosety-Rodríguez et al., 2002; Martinez et al., 2004). Mas a redução no número dessas células, em particular, podem causar aneurismas e vasodilatação do eixo venoso. Sendo importante ressaltar que a presença dessas patologias foram observadas, neste estudo, nas brânquias dos animais expostos ao Cr durante 15 e 45 dias.

A elevada quantidade do epitélio filamental, observada nos grupos 10VitC⁻ e 10VitC⁺ dos experimentos 1 e 2, do presente estudo, está correlacionada com hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamental, a qual levou à fusão parcial ou total das lamelas secundárias, conforme observado na histopatologia branquial deste estudo.

Em relação à quantidade das lamelas secundárias, os grupos VitC⁻ do experimento 1 não apresentaram diferença significativa em relação aos respectivos grupos VitC⁻ do experimento 2. Observou-se, também, que os grupos 20VitC⁻ dos experimentos 1 e 2 apresentaram valores, desse constituinte tecidual, similares ao Grupo Controle. Além disso, os grupos VitC⁺ do experimento 1 não apresentaram diferença estatística em relação aos respectivos grupos VitC⁺ do experimento 2. Pode-se inferir, portanto, que o tempo de exposição não influenciou na quantidade das lamelas secundárias e que a dosagem de 20 mg.L⁻¹ de Cr (VI) não afetou a integridade das lamelas secundárias. Infere-se, também, que a suplementação com a vitamina C não interferiu na preservação da integridade das lamelas secundárias e alguns dos seus constituintes, uma vez que não foi observado diferença estatística entre os grupos VitC⁻ e os grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2.

6.4.2. Análises morfométricas do fígado

O fígado, como o maior órgão envolvido com o metabolismo corporal, entra em contato direto com poluentes absorvidos do ambiente e que passam para a circulação sanguínea, portanto, não é de se estranhar que alterações histomorfológicas no fígado sejam frequentemente associadas à poluição do ambiente aquático (Saleh, 1982; Braunbeck et al., 1990; Gonzalez et al., 1993).

No presente estudo, foi constatado que a quantidade de citoplasma dos hepatócitos entre os grupos VitC⁻, dos experimento 1 e 2, e o Grupo Controle não apresentou diferença significativa. Observou-se, também, que os grupos VitC⁺, do experimento 1, não apresentaram diferença estatística em relação a quantidade desse

constituente tecidual nos respectivos grupos VitC⁻ e VitC⁺, do experimento 2. Além disso, a quantidade de citoplasma dos hepatócitos não diferiu, significativamente, entre os grupos VitC⁻ e VitC⁺, dos experimentos 1 e 2. Enquanto isso, a quantidade dos hepatócitos mononucleados foi observada em maior número nos grupos VitC⁻, dos experimentos 1 e 2, em relação ao grupos VitC⁺, dos experimentos 1 e 2. Ao passo que, os hepatócitos binucleados foram observados em maior quantidade nos grupos VitC⁺, dos experimentos 1 e 2, em relação ao grupos VitC⁻, dos experimentos 1 e 2. No presente estudo, sugere-se que o aumento na frequência de hepatócitos binucleados nos grupos VitC⁺ deve-se à necessidade do fígado dos lambaris em acelerar o metabolismo para metabolizar, de forma rápida, a vitamina C disponível no organismo, pois, uma vez metabolizada, a vitamina poderá auxiliar no processo de desintoxicação. Segundo Braunbeck et al., (1990) as alterações no número, no tamanho e na forma do núcleo dos hepatócitos podem ser devido à exposição a contaminantes. Gül et al. (2004) afirmaram que a histopatologia hepática em peixes de água doce de áreas poluídas leva a extensa proliferação de hepatócitos, indicando a aparente ação tóxica dos poluentes sobre o fígado.

A alteração no diâmetro nuclear de hepatócitos tem sido frequentemente considerada tanto como sinal de aumento da atividade metabólica quanto de patologia (Braunbeck et al., 1990). No caso deste estudo, o aumento observado nos animais dos grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2, em relação aos grupos VitC⁻, sugere que possa ser um sinal de aumento da atividade metabólica graças à presença da vitamina C. Uma possível explicação é, novamente, que assim que a vitamina C é metabolizada pelo organismo, poderá auxiliar no processo de desintoxicação que ocorre no tecido hepático.

Foi observado no presente estudo que os grupos VitC⁻ e VitC⁺, dos experimentos 1 e 2, apresentaram números elevados de infiltrados linfocitários, no fígado, em relação ao Grupo Controle. Ao passo que o grupo 20VitC⁻, do experimento, 1 e o grupo 20VitC⁺, do experimento 2, apresentaram maior número de infiltrados linfocitários em relação aos demais grupos VitC⁻ e VitC⁺, dos experimentos 1 e 2. Este último resultado corrobora com os resultados apresentados neste mesmo estudo, para histopatologia hepática, uma vez que inflamação e alteração no formato dos capilares sinusoides podem ser consideradas bioindicadores histopatológicos de estresse ambiental (Thomas, 1990; Köhler et al., 1992; Teh et al., 1997).

Em relação à quantidade dos capilares sinusoides, os mesmos foram observados em números aumentados nos grupos suplementados com a vitamina C, no presente estudo. Este achado se correlaciona com os resultados histopatológicos apresentados neste estudo, no tocante à presença de dilatação dos capilares e congestão sanguínea. A congestão vascular dos sinusoides ou em veias pequenas é uma mudança patológica frequentemente observada no fígado de animais expostos a substâncias tóxicas, e que as células hepáticas na área adjacente à congestão podem sofrer atrofia em casos mais severos (Wester, et al., 2002). Esta alteração é responsável pelo acúmulo de sangue que por consequência causa a dilatação dos vasos sanguíneos (Roberts, 1989). Este distúrbio circulatório está relacionado com a diminuição da velocidade de circulação de sangue no local. Em grandes proporções, causa diminuição das trocas metabólicas entre o plasma sanguíneo e o tecido hepático, causando danos às células locais, conforme foi constatado em peixes de água doce de áreas poluídas (Gül et al., 2004).

6.4.3. Análises morfométricas dos testículos

Poluentes como resíduos industriais e agrícolas causam vários efeitos deletérios no tecido das gônadas de peixes. Eles podem prejudicar o desenvolvimento de células germinativas e acumular-se nos testículos, afetando o processo da espermatogênese e podendo suprimir a produção de esperma, o que leva à uma redução na capacidade reprodutiva dos peixes (Shobikhuliatul et al., 2013). Portanto, estudos histomorfométricos das células germinativas podem servir como base para estudos toxicológicos (Pieterse e Van Vuren, 2002).

No presente estudo, a redução do número de cistos, observada em todos os grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 2, quando comparados aos respectivos grupos VitC⁻ e VitC⁺ do experimento 1 e ao Grupo Controle, sugere que o tempo de exposição ao metal interfere na constituição tecidual testicular e que a suplementação com a vitamina C não surtiu efeito protetor, ao longo dos 45 dias de tratamento, contra os danos causados pelo Cr (VI). Indivíduos de *Lebistes reticulatus* apresentaram redução significativa de cistos após exposição a 300 mg.L⁻¹ de zinco durante 20 dias (Sehgal e Saxena, 1986). Pieterse (2004) verificou a redução no número de cistos em *Oreochromis mossambicus* após exposição a 0,16, 0,4 e 2,0 mg.L⁻¹ de cobre, durante 96 h.

O aumento de espermatogônias observado no grupo 10VitC⁻, do experimento 1, e nos grupos 10VitC⁻ e 20VitC⁻, do experimento 2, em relação ao Grupo Controle e, também, no grupo 10VitC⁻, do experimento 1, em relação ao grupo 10VitC⁻, do experimento 2, indica que a exposição ao Cr (VI) no presente estudo causa alterações na proliferação destas células germinativas iniciais. O aumento no número de espermatogônias observado no grupo 20VitC⁺ do experimento 1 em relação ao grupo 20VitC⁻ do experimento 1, pode ser reflexo da ação protetora da vitamina C contra os danos tóxicos causados pela exposição ao Cr (VI). Diferentemente do observado nos mamíferos, as espermatogônias dos peixes teleósteos não se encontram em contato direto com a lâmina basal do túbulo seminífero, e sim, sempre completamente envolvidas pelas células de Sertoli (Schulz et al., 2005). O aumento no número de células de Sertoli observado nos grupos 1VitC⁻ dos experimentos 1 e 2 em relação ao Grupo Controle e aos demais grupos experimentais VitC⁻, pode indicar a existência de toxicidade, sendo que a proliferação destas células somáticas seria uma tentativa de proteger as células germinativas dos efeitos tóxicos causados pela exposição ao Cr (VI). Uma vez que as células de Sertoli têm como uma de suas funções a manutenção do ambiente adequado para a proliferação e maturação de células germinativas, qualquer alteração na função desta célula de suporte pode resultar em perda de células germinativas e, conseqüentemente, infertilidade (Boekelheide, et al., 2005). Teoricamente, qualquer substância tóxica pode produzir alterações detectáveis nas funções das células de Sertoli, o que em seguida pode ocasionar anormalidades nas células germinativas, sendo estes os primeiros sinais de lesão testicular (Miles-Richardson et al., 1999; Boekelheide, et al., 2005). No entanto, observou-se que o grupo 1VitC⁺ do experimento 1 apresentou número maior de Célula de Sertoli em relação ao Grupo Controle e aos demais grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2. Constatou-se, também, que não houve diferença, significativa, no número de Células de Sertoli entre os grupos VitC⁻ e VitC⁺, dos experimento 1 e 2. Hipertrofias e hiperplasias nas células de Sertoli foram observadas em indivíduos de *Morone americana* e *Cyprinus carpio* coletados no rio Hudson, EUA (Blazer, 2002).

No presente estudo, o aumento no número de espermatozoides no grupo 1VitC⁻ do experimento 1 em relação ao Grupo Controle e aos demais grupos experimentais dos experimentos 1 e 2. Não foi observada alteração no número dessas células entre os grupos, dos experimentos 1 e 2, que receberam o suplemento com a vitamina C e o Grupo Controle. No entanto o grupo 10 VitC⁺ do experimento 1

apresentou aumento de espermatozoides em relação ao grupo 10 VitC⁻ do experimento 1. Em relação a este último resultado, sugere-se que a vitamina C atuou como protetora contra os danos causados pelo metal nestas células germinativas avançadas. A redução no número de espermatozoides geralmente se reflete de forma negativa no processo reprodutivo e perpetuação das populações dos peixes (Pieterse e van Vuren, 2002; Pieterse, 2004). Pieterse (2004) observou uma redução na produção espermática em *Oreochromis mossambicus* após exposição a 0,16, 0,4 e 2,0 mg.L⁻¹ de cobre adicionado à água durante 96 h.

As alterações no número de cistos, espermatogônias e espermatozoides, além de proporção de intertúbulo, observadas neste estudo, podem ser reflexos da presença de algumas das diversas patologias observadas no testículo dos lambaris expostos ao Cr (VI), como, por exemplo, núcleos picnóticos, degenerações e necrose de células germinativas. Sendo muitas delas consideradas irreversíveis e, portanto, maléficas para a reprodução dos animais.

6.5. Análises das enzimas antioxidantes

6.5.1. Estresse oxidativo nas brânquias

A primeira enzima responsável pela defesa antioxidante da célula é a superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a dismutação (reação bioquímica que resulta um produto oxidado e um reduzido) do radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Em seguida, a catalase (CAT) realiza a desintoxicação celular, ao converter o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Fujioka e Casida, 2007). Por serem a primeira linha de defesa contra agentes tóxicos e genotóxicos (Pandey et al., 2003), a proporção dos níveis do sistema SOD/CAT é normalmente utilizada como biomarcador para indicar o nível de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Regoli et al., 2003; van der Oost et al., 2003). No presente estudo, os níveis crescentes da atividade de CAT nas brânquias dos animais dos grupos Vit C⁻ sugerem a presença de elevada quantidade de peróxido de hidrogênio, muito provavelmente induzida pela exposição ao Cr (VI). Na tentativa de reduzir a quantidade de peróxido de hidrogênio, foi necessário, portanto, o aumento dos níveis da enzima CAT no sistema antioxidante SOD/CAT. Em contrapartida, no experimento 2, tanto os níveis da enzima SOD quanto da CAT foram superiores nos grupos VitC⁻ e VitC⁺, quando comparados ao Grupo Controle. Mas à medida que a concentração do metal aumentou, os níveis destas enzimas decresceram. É possível

que o aumento da atividade destas enzimas contribua para a eliminação das EROs induzidas pela exposição ao poluente (Stara et al., 2012). O aumento das atividades de SOD e CAT foi observado em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações (0,1%, 1% e 10% do volume total do aquário) de água contaminada com efluentes de fábricas têxteis durante 15, 30 e 45 dias (Zagal e Mazmanci, 2011), em *Cyprinus carpio* expostos a 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de malation não associado ao licopeno, durante 14 dias (Yonar, 2013); e em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitroliol, sem associação com a vitamina C, durante 30 dias (El-Gawad e Hamid, 2013). Em relação às alterações na atividade da enzima CAT, foi relatado um aumento desta enzima em *Carassius auratus* L. expostos a 10 mg.L⁻¹ de Cr (VI) durante 24, 48 e 96 h (Kubrak et al., 2010); e em *Labeo rohita* expostos a 4,5 µg.L⁻¹ de malation durante exposições aguda (4 dias) e subcrônica (15 dias) (Patil e David, 2013). A redução da atividade da CAT foi observada em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,1, 0,5, 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹ de Cr (VI) durante 96 h; e em *Cyprinus carpio* expostos a 93,95, 187,9, 281,85 mg.L⁻¹ de Cr (VI) (K₂Cr₂O₇) durante 24, 48, 72 e 96 h (Kumar et al., 2013).

O aumento da atividade de SOD e a redução da atividade de CAT, observados nos grupos VitC⁺ do experimento 1, quando comparado aos grupos VitC⁻ no presente estudo, sugerem que a ação da enzima SOD, juntamente com a ação protetora da vitamina C, foi eficiente na tentativa de reduzir ou neutralizar as EROs geradas pela exposição ao Cr (VI). Não teria sido necessária, portanto, uma alta atividade da CAT para transformar H₂O₂ em H₂O + O₂. No entanto, a redução das atividades do sistema SOD/CAT, vista nos grupos Vit C⁺ em comparação com os grupos VitC⁻ do experimento 2 do presente estudo, inclusive a níveis próximos ao Grupo Controle, sugere que o tempo de exposição foi significativo para que a ação protetora da vitamina C se estabelecesse, juntamente com o sistema SOD/CAT, na tentativa de reduzir a formação das EROs em decorrência da exposição ao metal. Isto corrobora os indícios de que as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes podem ocorrer de um modo dependente da dose e do tempo de exposição do poluente, bem como da susceptibilidade das espécies expostas a ele (Cheung et al., 2001, El-Gawad e Hamid, 2013). A redução das atividades de CAT e SOD também foi observada em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitroliol, associado a suplementação com a vitamina C, durante 30 dias, quando comparado ao grupo que não recebeu a vitamina (El-Gawad e Hamid, 2013).

Um estudo anterior relatou que não houve diferença significativa da atividade de SOD entre os indivíduos de *Cyprinus carpio* expostos a 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de malation associado ao licopeno durante 14 dias, em relação ao Grupo Controle (Yonar, 2013).

A enzima antioxidante GST contribui para a segunda fase da desintoxicação do organismo após exposição a xenobióticos, através da eliminação de conjugados com a glutathione, sendo muito importante para a proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (Kubrak et al., 2010). O aumento da atividade da GST, observado nos grupos 1VitC⁻ e 20VitC⁻, dos experimentos 1 e 2 do presente estudo, indica o estabelecimento do estresse oxidativo induzido pela presença do Cr (VI), e que esta enzima está atuando no processo de desintoxicação do tecido branquial. O aumento da atividade da GST também foi observado em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitrotiol não associado a vitamina C, durante 30 dias (El-Gawad e Hamid, 2013). Os níveis de atividade da GST equivalentes ou inferiores ao Grupo Controle, observados nos grupos VitC⁺ do presente estudo, sugerem que a ação protetora da vitamina C, em conjunto com o processo de desintoxicação da enzima GST, conseguiu reduzir a formação de EROs induzida pelo Cr (VI). A redução da GST foi observada em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitrotiol, associado a suplementação com a vitamina C, durante 30 dias, em comparação com o grupo que não recebeu a vitamina (El-Gawad e Hamid, 2013). Kubrak et al. (2010) não observaram alterações significativas nos níveis de GST em indivíduos de *Carassius auratus* L. expostos a 10 mg.L⁻¹ de Cr (III) e Cr (VI) durante 24, 48 e 96h.

A formação de proteínas carboniladas, como produto da oxidação de proteínas a partir de reações às EROs, pode ser classificada como irreversível e leva a alterações conformacionais e redução das atividades catalíticas das enzimas (Zhang et al., 2008). Com isso, o aumento de proteínas carboniladas em amostras de tecidos tornou-se um biomarcador amplamente utilizado em testes de estresse oxidativo (Zhang et al., 2008). Neste estudo, as brânquias de animais dos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2 apresentaram altos níveis de proteínas carboniladas. Concentrações elevadas de proteínas carboniladas, sob condições oxidantes, podem indicar a presença de uma elevada porcentagem de proteínas disfuncionais, podendo contribuir para danos celulares e até mesmo a morte celular, devido ao estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004). Interessantemente, no presente estudo, os grupos VitC⁺ apresentaram níveis de proteínas carboniladas próximos aos do Grupo

Controle, indicando que a vitamina C atuou como protetora contra a geração dos radicais $\text{OH}\cdot$ gerados pela exposição ao Cr (VI) e responsáveis justamente pela carbonilação de proteínas (Farber e Levine, 1986; Oliver, 1987). Um aumento nos níveis de proteínas carboniladas também foi relatado para *Labeo rohita* expostos a $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de malation durante exposições aguda (4 dias) e subcrônica (15 dias) (Patil e David, 2013).

6.5.2. Estresse oxidativo no fígado

A atividade antioxidante da SOD tem papel significativo nos mecanismos de defesa nas células (Kono e Fridovich, 1982; Pandey et al., 200; Hermes-Lima, 2004). Modulações da atividade da SOD são indicadores precoces de estresse oxidativo em sistemas biológicos (Kono e Fridovich, 1982; Pandey et al., 2001; Hermes-Lima, 2004). Não obstante, a catalase (CAT) pode ser um dos marcadores enzimáticos mais sensíveis à presença das EROs, e, devido ao fato de sua atividade ser modulada por vários fatores, incluindo a produção de radicais superóxido, ela é uma das enzimas antioxidantes mais utilizadas em pesquisas para estudar o estresse oxidativo em peixes (Kono e Fridovich, 1982; Pandey et al., 2001). Neste estudo, foram observados níveis consideravelmente altos da atividade de CAT e níveis reduzidos da atividade de SOD no tecido hepático dos animais dos grupos Vit C⁻. O aumento da CAT sugere a presença elevada de peróxido de hidrogênio, o que provavelmente foi decorrente da exposição ao Cr (VI). O que indica que o processo de estresse oxidativo estava em sua fase inicial, onde elevados níveis de CAT foram necessários para atuar na redução da quantidade de peróxido de hidrogênio. Há relatos da redução da atividade da SOD em *Carassius auratus* expostos por 96 h a 1, 2,5, 5 e 10 mg.L^{-1} de Cr (III) adicionado na água (Lushchak et al., 2009); e em *Carassius auratus* expostos por 96 h a 10 e 50 mg.L^{-1} de Cr (VI) adicionado na água (Lushchak et al., 2008). Kubrak et al. (2010) e Li et al. (2011) não observaram alterações significativas nos níveis de SOD em *Caurassius auratus* expostos a 10 mg.L^{-1} de Cr (VI) e Cr (III) durante 24, 48 e 96h, e em *Oncorhynchus mykiss* expostos a 50, 100 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cr (VI) durante 7 dias, respectivamente. Um aumento da atividade desta enzima foi relatado em *Cyprinus carpio* expostos a 0,5 e 1 mg.L^{-1} de malation não associado ao licopeno, durante 14 dias (Yonar, 2013). O aumento de SOD e CAT foi relatado em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações (0,1%, 1% e 10% do volume total do aquário) de água contaminada

com efluentes de fábricas têxteis durante 15, 30 e 45 dias (Zagal e Mazmanci, 2011) e em *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitroliol, sem associação com a vitamina C, durante 30 dias (El-Gawad e Hamid, 2013). Em relação aos níveis de CAT, resultados similares foram observados em *Cyprinus carpio* expostos a 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de malation não associado ao licopeno, durante 14 dias (Yonar, 2013) e em *Labeo rohita* expostos a 4,5 µg.L⁻¹ de malation durante o exposições aguda (4 dias) e subcrônica (15 dias) (Patil e David, 2013). Contrapondo o que foi observado neste estudo, níveis reduzidos da atividade da CAT foram relatados em *Carassius auratus* expostos por 96 h a 10 e 50 mg.L⁻¹ de Cr (VI) adicionado à água (Lushchak et al., 2008). Enquanto Velma e Tchounwou (2010) observaram tanto aumento quanto redução nos níveis de CAT, mas não significativos, em *Carassius auratus* expostos a 4,25 e 8,57 ppm de Cr (VI) durante 4 semanas.

A vitamina C é um antioxidante em potencial que pode auxiliar o organismo a eliminar as EROs, impedindo, assim, danos aos tecidos (Pincemail et al., 2002; Kelly et al., 2004; Wong et al., 2013). O aumento dos níveis de SOD e CAT observado nos grupos Vit C⁺ dos experimentos 1 e 2 do presente estudo, sugere que a vitamina C, como parte do sistema antioxidante, atuou protegendo contra a formação de radicais livres, reduzindo assim, as EROs induzidas pela intoxicação ao Cr (VI). A redução de CAT e SOD também foi observada no tecido hepático de indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitroliol, associado a suplementação com a vitamina C, durante 30 dias, quando comparado ao grupo que não recebeu a vitamina (El-Gawad e Hamid, 2013). Yonar (2013) relataram que os níveis de SOD estavam normalizados e os de CAT reduzidos em *Cyprinus carpio* expostos a 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de malation associado ao licopeno, durante 14 dias.

As Glutathione S-transferases (GST) constituem uma grande família de enzimas multifuncionais que é formada a partir da Glutathione reduzida (GSH). A enzima GST se conjuga a xenobióticos e aldeídos, produtos da peroxidação de lipídios (Hermes-Lima, 2004). Os conjugados formados nas células hepáticas são frequentemente excretados pela bile através das bombas dependentes de ATP, ou podem ser degradados e acetilados para formar conjugados de N-acetilcisteína (ácidos mercaptúricos), os quais serão excretados na urina (Hermes-Lima, 2004). A reduzida atividade da GST hepática nos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2 do presente estudo pode ser um indício de que o estresse oxidativo, induzido pelo Cr (VI), inibiu

a atividade desta enzima . Lushchak et al. (2008) e Canabarro e Toledo (2010) também observaram níveis reduzidos de GST no fígado de *Carassius auratus* expostos por 96 h a 10 e 50 mg.L⁻¹ de Cr (VI), adicionados à água, e de *Oreochromis niloticus* capturados ao longo da bacia do rio Piragibu-Mirim na região de Sorocaba, respectivamente. O aumento da atividade da GST também foi relatado em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos durante 30 dias a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitrotiol não associado a vitamina C (El-Gawad e Hamid, 2013). Por tudo acima exposto, os valores crescentes da atividade da GST observados no fígado dos animais dos grupos VitC⁺ do presente estudo, podem ser um indício de que os níveis desta enzima estejam se normalizando, se aproximando dos níveis apresentados pelo Grupo Controle. Isto permite inferir, portanto, que a vitamina C, juntamente com o sistema SOD/CAT foram eficientes na redução da geração das EROs em decorrência da exposição ao Cr (VI). Uma redução da atividade da GST foi relatada em indivíduos de *Oreochromis niloticus* expostos durante 30 dias a 0,04 mg.L⁻¹ do pesticida fenitrotiol, associado a suplementação com a vitamina C, em comparação com o grupo que não recebeu a vitamina (El-Gawad e Hamid, 2013).

Danos causados nas proteínas, ou na modificação química de aminoácidos em proteínas durante o estresse oxidativo, podem originar a formação de proteínas carboniladas. No presente estudo, o aumento na concentração de proteínas carboniladas nos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2 pode indicar que a intoxicação por Cr (VI) induziu alterações na síntese de proteínas. Em contrapartida, a redução das proteínas carboniladas nos grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2 deste estudo permite inferir que a vitamina C teve ação protetora sobre o radical OH•, o qual, que além de ser um tipo de EROs induzido pelo Cr, é considerado responsável pela formação de grupos carbonila nas proteínas. Ou seja, a vitamina atuou eficientemente no mecanismo de defesa no fígado, protegendo as proteínas de modificações covalentes, geradas pela oxidação celular, e levando à inibição da carbonilação de proteínas (Farber e Levine, 1986; Oliver, 1987). O aumento de proteínas carboniladas foi também relatado em *Channa punctata* (Bloch) expostos a 0,75 µg L⁻¹ de deltametrina, 10 g L⁻¹ de endossulfam e 5 mg.L⁻¹ de paraquat durante 48 h (Parveza e Raisuddin, 2005) e em *Labeo rohita*, expostos a 4,5 µg L⁻¹ de malation durante o exposição aguda (4 dias) e subcrônica (15 dias) (Patil e David, 2013).

6.5.3. Estresse oxidativo no músculo

O desempenho do sistema SOD/CAT é frequentemente utilizado em peixes como biomarcador para indicar a neutralização da geração das EROs em decorrência da exposição a algum agente estressor (Regoli et al., 2003; van der Oost et al, 2003). Neste estudo, houve níveis relativamente altos da atividade de CAT e níveis reduzidos da atividade de SOD no tecido muscular dos animais dos grupos Vit C⁻. Sugerindo, que a exposição ao metal e a catalisação do superóxido pela enzima SOD gerou a formação de peróxido de hidrogênio. Um estudo relata o aumento dos níveis de SOD e CAT no músculo de *Brycon cephalus* expostos por 96 h a 2 mg.L⁻¹ de Folisuper 600 BR ® (MP formulação comercial - MPC, 600 g L⁻¹) (Monteiro et al., 2009).

Os níveis da atividade das enzimas SOD e CAT, observado nos grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2, em comparação ao Grupo Controle no presente estudo, sugere a interação destas enzimas antioxidantes com a vitamina C, na tentativa de neutralizar as EROs induzidas pela exposição ao Cr (VI). Estas interações indicam que o padrão de resposta do sistema de SOD/CAT devido à exposição ao Cr (VI) foi influenciado pela presença da suplementação da vitamina C na dieta. A redução das atividades de SOD e CAT foi também relatada em indivíduos de *Brycon cephalus* expostos por 96 h a 2 mg.L⁻¹ de Folisuper 600 BR ® (MP formulação comercial - MPC , 600 g L⁻¹) associado ao selênio (Monteiro et al., 2009).

O aumento da atividade da GST observado nos grupos VitC⁻, em relação ao grupo VitC⁺ do presente estudo, sugere que a bioacumulação do Cr (VI) disparou reações que culminaram na geração de EROs, e ainda influenciou nas reações de defesa efetuada pelas enzimas antioxidantes, causando, assim, alterações no processo de desintoxicação realizado pela enzima GST. A redução da atividade da GST nos grupos 1VitC⁺ e 10VitC⁺ do presente estudo permite se inferir que a suplementação com a vitamina C, juntamente com o mecanismo de desintoxicação pela GST, propiciou a diminuição da geração de EROs induzida pelo Cr (VI). Isto somente corrobora o papel fundamental da GST na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (Fournier et al., 1992). Monteiro et al. (2009) relataram o aumento da atividade da GST no tecido muscular de *Brycon cephalus* expostos por 96 h a 2 mg.L⁻¹ de Folisuper 600 BR ® (MP formulação comercial - MPC, 600 g L⁻¹) associado ou não ao selênio.

A introdução de grupos carbonila a proteínas durante o estresse oxidativo, bem como a medição dos níveis de proteínas carboniladas, podem ser utilizados como biomarcadores da exposição a poluentes (Parveza e Raisuddin, 2005). No presente estudo, o aumento das proteínas carboniladas nos grupos VitC⁻ dos experimentos 1 e 2, indica que a intoxicação por Cr (VI) provavelmente provocou aumento da geração de EROs e, conseqüentemente, a maior síntese de proteínas disfuncionais. Em contrapartida, a redução das proteínas carboniladas nos grupos VitC⁺ dos experimentos 1 e 2 no tecido muscular dos animais do presente estudo sugere que a vitamina C atuou na defesa, impedindo a modificação covalente das proteínas, ou seja, adição do grupo carbonila. A formação deste tipo de proteínas disfuncionais é comumente relatada como consequência da oxidação celular induzida pela intoxicação ao Cr (Farber e Levine, 1986; Oliver, 1987). Por tudo acima exposto, pode-se afirmar que a quantidade de proteínas carboniladas pode fornecer informações importantes e que são potenciais indicadores de estresse oxidativo em peixes expostos ao Cr.

6.6. Biossorção e *Cocos nucifera* L.

A casca do coco verde é uma matéria orgânica constituída principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio. Por possuir a morfologia porosa com superfícies irregulares, ela facilita a remoção de metais em solução (Pino et al., 2006). Neste estudo, a quantidade de Cr (VI) removida das soluções que ficaram em contato com o pó da casca de coco verde durante 2 h foi superior à quantidade do metal removido das soluções que ficaram em contato com a matéria orgânica por 1 h. Inferindo, assim, que o poder de remoção do Cr (VI) aumenta à medida que se prolonga o tempo de contato com o pó da casca de coco verde. Bhattacharya et al. (2008), ao testarem diferentes materiais adsorptivos, constataram que nas primeiras 2h de contato do metal com o material adsorvente, a remoção ocorria mais rapidamente. Após este período, o sistema adsorvente/solução tendia a atingir o equilíbrio de concentração, permanecendo, assim, com o percentual de remoção diminuído. Resultados similares foram verificados por Pino et al. (2006), ao testarem o potencial biossorptivo do pó da casca de coco na remoção de 20 ppm de diferentes metais, incluindo o Cr (VI), da água. Hasany e Ahmad (2006) também observaram a eficiência no processo de remoção dos metais: cromo trivalente [Cr (III)], cádmio [Cd (II)] e mercúrio [Hg (II)], utilizando o pó da casca de coco verde como material adsorvente.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que a exposição ao Cr (VI), os diferentes períodos, a saber, 15 e 45 dias, além de levar a bioacumulação deste metal em diferentes órgãos, causou alterações patológicas e morfométricas nas brânquias, fígado e testículos, bem como alterações enzimáticas e induziu estresse oxidativo nos tecidos branquial, hepático e muscular de indivíduos de *A. aff. bimaculatus*.

Esta exposição ao metal aumentou a síntese de radicais livres nos tecidos dos peixes e conseqüentemente aumentou a síntese de proteínas disfuncionais nos tecidos estudados. Respostas diferenciadas nas atividades das enzimas SOD, CAT e GST, observadas nas brânquias, fígado e músculo dos lambaris, expostos ao Cr (VI) associado ou não à vitamina C, indicam a presença de mecanismos desiguais na regulação da expressão de genes para estas enzimas ou na competência fisiológica de cada órgão. Alguns fatores como o tempo de exposição e a dose do Cr (VI) também podem ter levado os tecidos a respostas antioxidantes diferentes.

Em relação ao efeito protetor da vitamina C, a partir dos resultados histológicos e enzimáticos obtidos no presente estudo, conclui-se que a vitamina atuou em diferentes graus nos diferentes tecidos estudados. Sendo que os resultados dos testes enzimáticos apresentaram maior ação benéfica desta vitamina junto às enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST, na tentativa de reduzir ou neutralizar o estresse oxidativo e os danos produzidos nas brânquias, fígado e músculo, após exposição ao Cr (VI). Portanto, houve efeito positivo do uso desta vitamina na redução da ocorrência e da frequência de algumas, das diversas histopatologias estudadas, na manutenção de células e estruturas importantes para o funcionamento dos órgãos estudados e na regulação do sistema enzimático dos tecidos estudados, onde agiu como protetora dos diferentes tecidos estudados.

Os resultados demonstrados neste estudo apontam que o pó da casca de coco verde, resíduo agroindustrial biodegradável e fonte renovável, tem sim grande potencial como material biossorvente de baixo custo para tratamento de efluentes industriais contaminados com metais pesados, principalmente o Cr (VI). A utilização da casca de coco como bioadsorvente seria uma excelente forma de aproveitamento desta biomassa, já que cerca de 400 mil toneladas anuais são produzidas no Brasil.

8. TABELAS

Tabela 1: Classificação da severidade das lesões por categoria de índice de alteração histopatológica (IAH), segundo Polëksic e Mitrovic-Tutundžic (1994).

Categorias	Severidade das alterações (órgão)
0-10	Funcionamento normal
11-32	Leve
33-54	Moderada
55- 76	Intensa
77-100	Severa
>100	Irreversível

Tabela 2: Critérios para pontuação das lesões em função da ocorrência das alterações nas brânquias, fígado e testículos modificado de Schwaiger et al. (1997).

Pontuação	Ocorrência das alterações
0 (zero)	Alteração não observada
1 (discreta)	1 a 5 ocorrências
2 (moderada)	6 a 10 ocorrências
3 (intensa)	11 a 15 ocorrências
4 (severa)	Acima de 15 ocorrências

Tabela 3: Porcentagem da mortalidade de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.

Concentrações de Cr (VI) (mg.L ⁻¹)	Mortalidade (%)						
	Tempo (dias)						
	1	8	15	22	29	36	45
Controle	0	0	0	0	0	0	0
1Vit C ⁻	0	0	0	0	0	0	0
10Vit C ⁻	0	0	0	0	0	0	0
20Vit C ⁻	0	0	0	20	0	0	10
1Vit C ⁺	0	0	0	0	0	0	0
10Vit C ⁺	0	0	0	0	0	0	0
20Vit C ⁺	0	0	0	10	0	0	10

Tabela 4: Acumulação de Cr nos tecidos de machos de *Astyanax* aff. *bimaculatus* submetidos a diferentes concentrações deste metal na água durante 15 e 45 dias.

	ÓRGÃOS (mg.g ⁻¹)	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
		C	1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺
EXPERIMENTO 1	Cabeça	0,001±0,00 ^a	3,153±0,05 ^b	5,550±0,54 ^c	10,953±0,06 ^d	1,33±0,15 ^e	2,43±0,20 ^f	4,14±0,15 ^g
	Testículos	0,001±0,00 ^a	6,471±0,58 ^a	10,613±3,55 ^a	29,308±7,50 ^b	3,34±0,76 ^a	2,74±0,92 ^a	5,96±0,23 ^a
	Brânquias	0,001±0,00 ^a	16,333±4,24 ^b	26,650±1,59 ^c	57,657±0,10 ^d	6,41±0,05 ^e	14,91±2,09 ^b	13,54±4,87 ^b
	Fígado	0,001±0,00 ^a	40,500±6,36 ^b	45,417±1,76 ^b	75,892±3,61 ^c	8,93±0,50 ^d	43,500±2,12 ^b	18,417±1,29 ^c
	Intestino	0,001±0,00 ^a	29,688±5,74 ^b	63,344±4,52 ^c	73,258±2,91 ^d	22,269±1,03 ^{bc}	15,943±2,93 ^e	27,792±2,77 ^b
	Músculo	0,001±0,00 ^a	2,069±0,18 ^{ab}	3,213±0,25 ^c	4,579±0,80 ^d	1,448±0,25	3,545±0,33 ^c	2,374±0,02 ^{bc}
	Vértebras	0,001±0,00 ^a	4,021±0,04 ^a	18,940±0,98 ^b	18,636±0,55 ^b	2,307±0,18 ^a	4,288±0,56 ^a	17,216±2,30 ^b
EXPERIMENTO 2	Cabeça	0,001±0,00 ^a	5,357±1,72 ^b	8,725±1,29 ^c	22,653±1,69 ^d	0,808±0,01 ^a	5,080±0,67 ^b	8,981±0,34 ^c
	Testículos	0,001±0,00 ^a	15,044±2,09 ^b	39,784±2,11 ^c	59,553±3,20 ^d	2,024±0,53 ^a	2,245±0,21 ^a	4,965±1,18 ^a
	Brânquias	0,001±0,00 ^a	18,384±1,94 ^b	31,022±2,91 ^c	73,575±2,56 ^d	5,151±1,02 ^e	18,208±2,91 ^b	16,410±1,03 ^b
	Fígado	0,001±0,00 ^a	48,340±0,50 ^b	58,764±2,35 ^c	82,253±1,16 ^d	16,583±2,39 ^e	49,406±1,29 ^b	25,221±2,39 ^f
	Intestino	0,001±0,00 ^a	36,593±0,26 ^b	68,438±2,21 ^c	97,897±3,29 ^d	24,814±2,43 ^e	19,443±2,01 ^f	28,936±1,32 ^e
	Músculo	0,001±0,00 ^a	3,168±0,61 ^b	5,966±1,27 ^c	10,002±0,58 ^d	0,648±0,14 ^a	6,045±1,03 ^c	4,374±0,02 ^{bc}
	Vértebras	0,001±0,00 ^a	13,137±1,07 ^b	19,285±1,13 ^c	38,572±1,00 ^d	5,788±0,14 ^e	6,500±1,41 ^e	11,716±1,59 ^b

*Letras iguais na mesma linha indicam que médias não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls. P<0.05.

Tabela 5: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de *Astyanax aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.

	PATOLOGIAS	IAH	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
			1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺	
EXPERIMENTO 1	Dilatação dos canais vasculares	I	75,00	50,00	0,00	33,33	83,33	100,00	
	Aumento do espaço interlamelar secundário	I	50,00	0,00	85,00	100,00	83,33	80,00	
	Hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar	I	50,00	0,00	20,00	90,00	93,33	35,00	
	Deformação da lamela primária	I	50,00	40,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Redução do espaço interlamelar secundário	I	65,00	30,00	20,00	23,33	46,66	15,00	
	Fusão e desorganização da lamela secundária	I	100,00	30,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Hipertrofia e hiperplasia das células mucosas	II	100,00	10,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Ruptura epitélio lamelar	II	100,00	30,00	100,00	100,00	90,00	100,00	
	Hipertrofia e hiperplasia das células de cloro	II	100,00	40,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	Descamação do epitélio	II	0,00	20,00	20,00	16,66	0,00	85,00	
	Vacuolizações	III	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00	50,00	
	Necroses e degenerações celulares	III	65,00	10,00	100,00	13,33	100,00	100,00	
	Aneurismas lamelares	III	100,00	50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
	EXPERIMENTO 2	Dilatação dos canais vasculares	I	52,00	45,00	0,00	33,33	100,00	100,00
		Aumento do espaço interlamelar secundário	I	70,00	0,00	0,00	100,00	0,00	80,00
Hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar		I	60,00	0,00	0,00	75,00	100,00	100,00	
Deformação da lamela primária		I	100,00	65,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Redução do espaço interlamelar secundário		I	8,00	45,00	0,00	50,00	100,00	20,00	
Fusão e desorganização da lamela secundária		I	100,00	65,00	0,00	100,00	100,00	100,00	
Hipertrofia e hiperplasia das células mucosas		II	100,00	30,00	0,00	100,00	100,00	100,00	
Ruptura epitélio lamelar		II	100,00	45,00	100,00	100,00	60,00	100,00	
Hipertrofia e hiperplasia das células de cloro		II	100,00	60,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Descamação do epitélio		II	6,00	25,00	100,00	16,66	0,00	85,00	
Vacuolizações		III	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00	50,00	
Necroses e degenerações celulares		III	100,00	55,00	100,00	55,00	100,00	100,00	
Aneurismas lamelares		III	100,00	85,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

Tabela 6: Classificação das alterações histopatológicas das brânquias de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.

	PATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)					
		1Vit ⁻	10Vit ⁻	20Vit ⁻	1Vit ⁺	10Vit ⁺	20Vit ⁺
EXPERIMENTO 1	Dilatação dos canais vasculares	Discreta	Discreta	Não Observada	Discreta	Moderada	Severa
	Aumento do espaço interlamelar secundário	Discreta	Não Observada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar	Discreta	Não Observada	Discreta	Discreta	Moderada	Moderada
	Deformação da lamela primária	Discreta	Discreta	Moderada	Severa	Moderada	Moderada
	Redução do espaço interlamelar secundário	Discreta	Discreta	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta
	Fusão e desorganização da lamela secundária	Moderada	Discreta	Moderada	Severa	Moderada	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia das células mucosas	Moderada	Discreta	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada
	Ruptura epitélio lamelar	Moderada	Discreta	Moderada	Severa	Moderada	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia das células de cloro	Moderada	Discreta	Moderada	Severa	Moderada	Moderada
	Descamação do epitélio	Não Observada	Discreta	Discreta	Discreta	Não Observada	Moderada
	Vacuolizações	Moderada	Não Observada	Não Observada	Não Observada	Moderada	Discreta
	Necroses e degenerações celulares	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Moderada	Moderada
Aneurismas lamelares	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	
EXPERIMENTO 2	Dilatação dos canais vasculares	Discreta	Discreta	Não Observada	Discreta	Moderada	Moderada
	Aumento do espaço interlamelar secundário	Discreta	Não Observada	Não Observada	Moderada	Não Observada	Moderada
	Hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar	Discreta	Não Observada	Não Observada	Discreta	Moderada	Moderada
	Deformação da lamela primária	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Redução do espaço interlamelar secundário	Discreta	Discreta	Não Observada	Discreta	Moderada	Discreta
	Fusão e desorganização da lamela secundária	Moderada	Discreta	Não Observada	Moderada	Moderada	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia das células mucosas	Moderada	Discreta	Não Observada	Moderada	Moderada	Moderada
	Ruptura epitélio lamelar	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia das células de cloro	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Descamação do epitélio	Discreta	Discreta	Moderada	Discreta	Não Observada	Moderada
	Vacuolizações	Moderada	Não Observada	Não Observada	Não Observada	Moderada	Discreta
	Necroses e degenerações celulares	Moderada	Discreta	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada
Aneurismas lamelares	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	

Tabela 7: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas do fígado detectadas em machos de *Astyanax aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.

	PATOLOGIAS	IAH	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)					
			1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺
EXPERIMENTO 1	Infiltração de linfócitos	I	25,00	90,00	93,33	50,00	46,66	40,00
	Vacuolização hepatocelular	I	80,00	90,00	90,00	100,00	100,00	100,00
	Hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos	I	80,00	40,00	13,33	26,66	26,66	65,00
	Núcleo picnótico	II	95,00	80,00	96,66	83,33	70,00	55,00
	Desorganização do cordão hepático	II	90,00	90,00	93,33	100,00	100,00	100,00
	Congestão sanguínea e dilatação sinusóide	II	5,00	20,00	23,33	36,66	23,33	25,00
	Necrose e degenerações de hepatócitos	III	100,00	90,00	30,00	100,00	100,00	100,00
EXPERIMENTO 2	Infiltração de linfócitos	I	66,00	95,40	60,00	45,00	60,00	25,00
	Vacuolização hepatocelular	I	64,00	100,00	80,00	100,00	100,00	100,00
	Hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos	I	32,00	0,00	0,00	0,00	30,00	25,00
	Núcleo picnótico	II	44,00	90,00	90,00	82,00	60,00	50,00
	Desorganização do cordão hepático	II	68,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Congestão sanguínea e dilatação sinusóide	II	42,00	55,00	40,00	61,00	40,00	25,00
	Necrose e degenerações de hepatócitos	III	72,00	85,00	100,00	100,00	60,00	85,00

Tabela 8: Classificação das alterações histopatológicas do fígado de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.

PATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
	1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺	
EXPERIMENTO 1	Infiltração de linfócitos	Discreta	Moderada	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta
	Vacuolização hepatocelular	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
	Núcleo picnótico	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta
	Desorganização do cordão hepático	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Congestão sanguínea e dilatação sinusoide	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
	Necrose e degenerações de hepatócitos	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
EXPERIMENTO 2	Infiltração de linfócitos	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
	Vacuolização hepatocelular	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos	Discreta	Não Observada	Não Observada	Não Observada	Discreta	Discreta
	Núcleo picnótico	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Discreta
	Desorganização do cordão hepático	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	Congestão sanguínea e dilatação sinusoide	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
	Necrose e degenerações de hepatócitos	Discreta	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada

Tabela 9: Percentuais de patologias das alterações histopatológicas dos testículos detectadas em machos de *Astyanax aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de Cr (VI) na água por 15 e 45 dias.

PATOLOGIAS	IAH	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
		1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺	
EXPERIMENTO 1	Dilatação intertubular	I	55,00	10,00	13,33	5,00	5,00	0,00
	Agrupamento nuclear	II	60,00	100,00	100,00	100,00	10,00	100,00
	Vacúolos	II	95,00	80,00	76,66	25,00	100,00	70,00
	Ruptura de cistos	II	40,00	40,00	36,66	30,00	0,00	60,00
	Necroses e degenerações	III	75,00	70,00	33,33	25,00	10,00	40,00
	Núcleo picnótico	III	100,00	90,00	100,00	100,00	10,00	100,00
EXPERIMENTO 2	Dilatação intertubular	I	10,00	15,00	100,00	5,00	30,00	0,00
	Agrupamento nuclear	II	100,00	100,00	0,00	90,00	0,00	90,00
	Vacúolos	II	100,00	95,00	100,00	25,00	30,00	20,00
	Ruptura de cistos	II	30,00	50,00	100,00	30,00	0,00	0,00
	Necroses e degenerações	III	84,00	85,00	100,00	15,00	10,00	10,00
	Núcleo picnótico	III	100,00	100,00	100,00	100,00	20,00	90,00

Tabela 10: Classificação das alterações histopatológicas dos testículos de acordo com os valores médios das alterações (VMA) de lambaris expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) durante 15 e 45 dias.

PATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
	1Vit ⁻	10Vit ⁻	20Vit ⁻	1Vit ⁺	10Vit ⁺	20Vit ⁺	
EXPERIMENTO 1	Dilatação intertubular	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Não Observada
	Agrupamento nuclear	Moderada	Moderada	Moderada	Severa	Moderada	Moderada
	Vacúolos	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada	Moderada
	Ruptura de cistos	Discreta	Não Observada	Discreta	Discreta	Não Observada	Moderada
	Necroses e degenerações	Moderada	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
	Núcleo picnótico	Moderada	Moderada	Moderada	Intensa	Discreta	Moderada
EXPERIMENTO 2	Dilatação intertubular	Discreta	Discreta	Moderada	Discreta	Discreta	Não Observada
	Agrupamento nuclear	Moderada	Moderada	Não Observada	Moderada	Não Observada	Moderada
	Vacúolos	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Discreta	Não Observada
	Ruptura de cistos	Discreta	Discreta	Moderada	Não Observada	Não Observada	Não Observada
	Necroses e degenerações	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Discreta	Discreta
	Núcleo picnótico	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada

9. FIGURAS

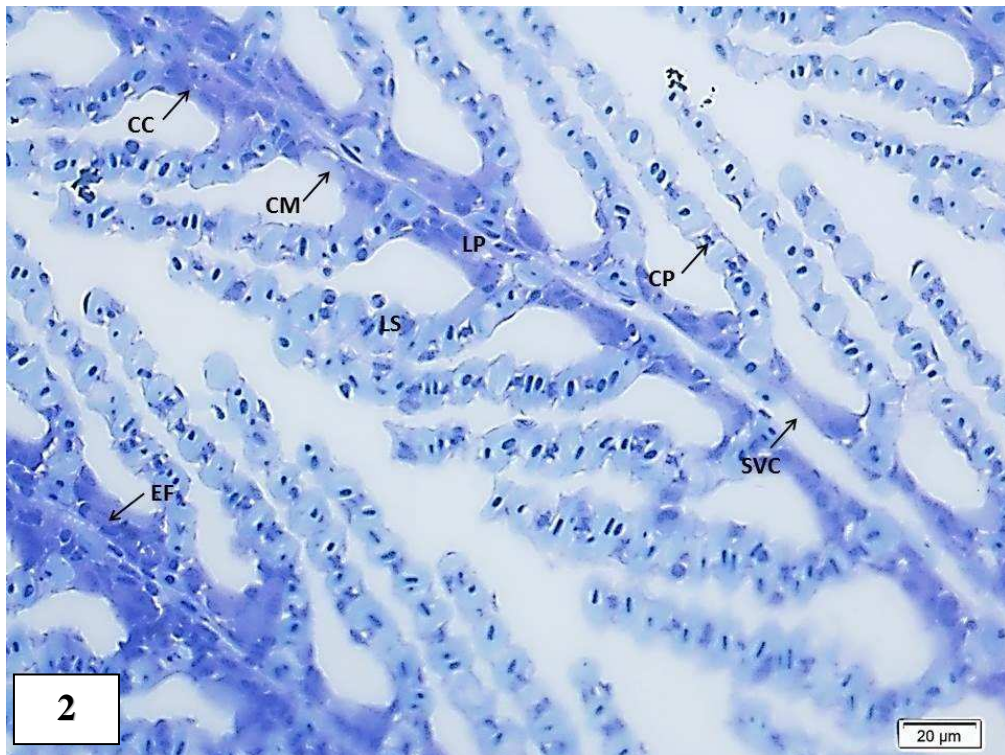


Figura 2: Organização estrutural dos filamentos branquiais de *Astyanax* aff. *bimaculatus* do Grupo Controle: seio venoso central (SVC), epitélio filamental (EF), célula pilar (CP), célula de cloro (CC), célula mucosa (CM), lamela primária (LP), lamela secundária (LS). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm.

Figura 3A: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (1VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (A) aneurisma; (ND) necrose e degenerações celulares; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 3B: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (1VitC⁺): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamentar; (DE) descamação do epitélio; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DCV) dilatação dos canais vasculares. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

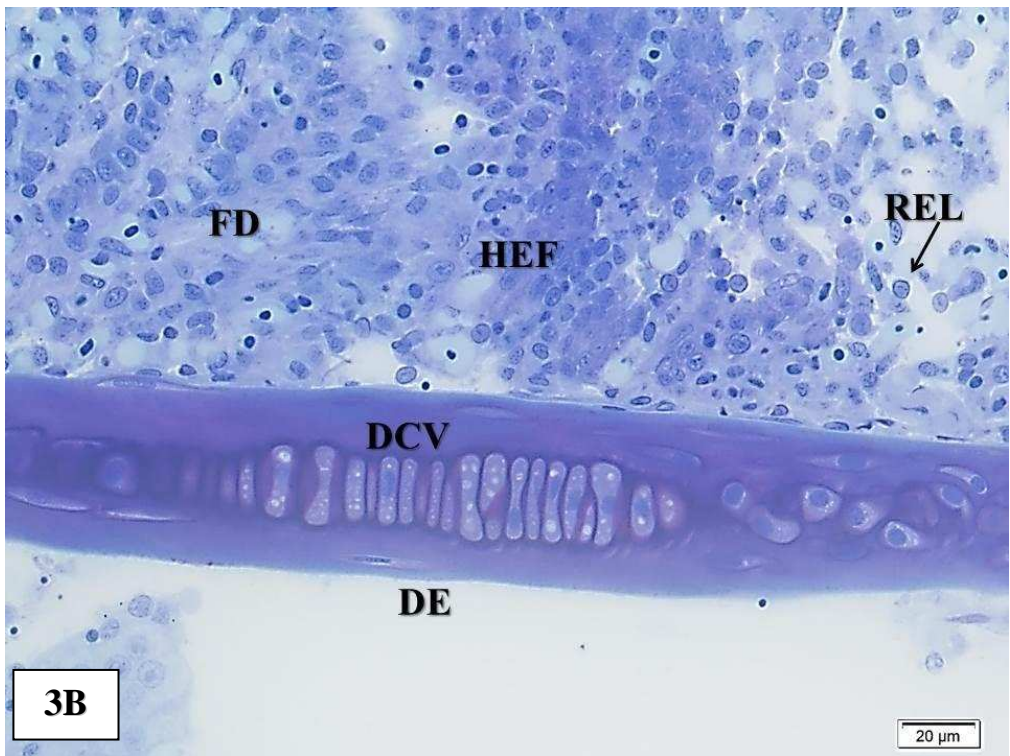
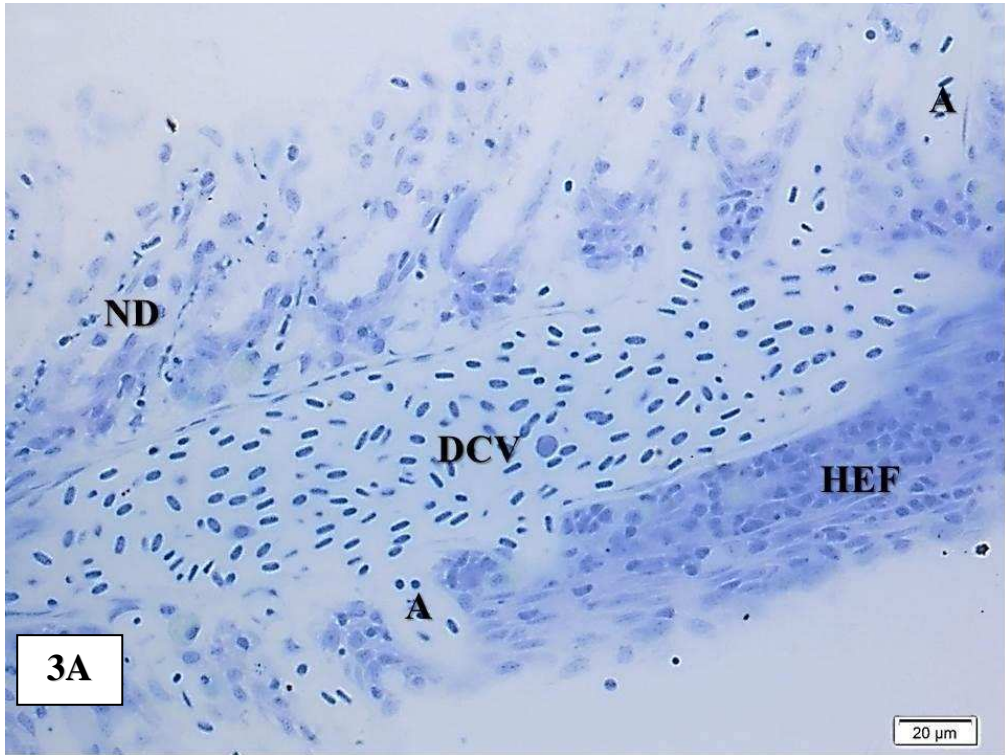


Figura 3C: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (10VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (A) aneurisma; (ND) necrose e degenerações celulares; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 3D: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (10VitC⁺): (VD) vacuolização degenerativas; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamental; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (REIS) redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

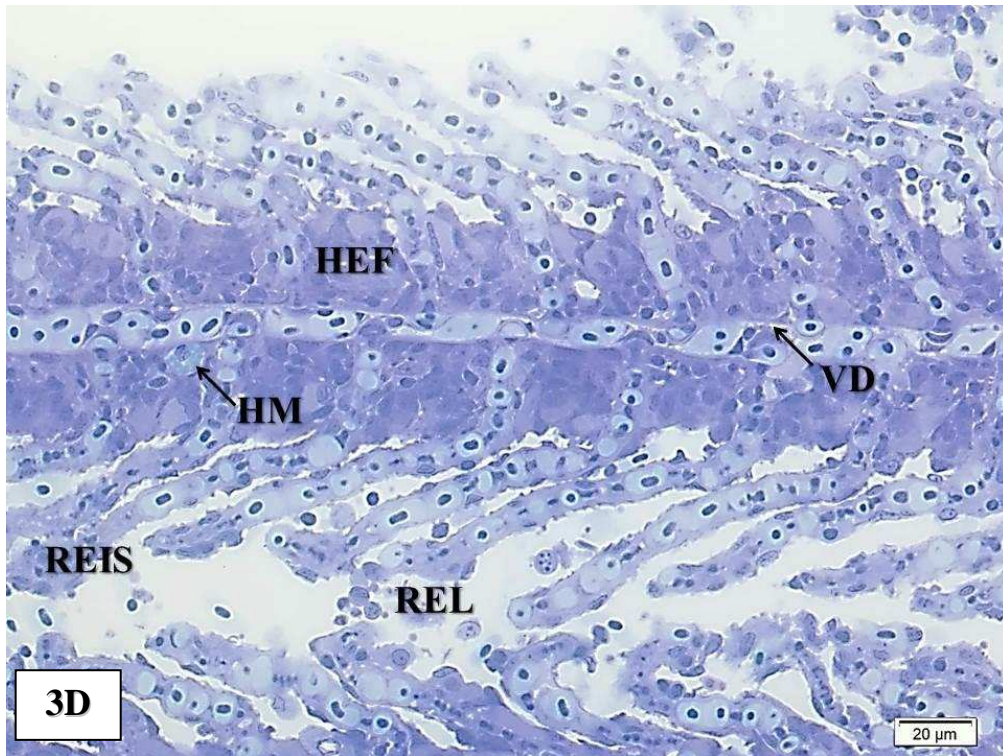
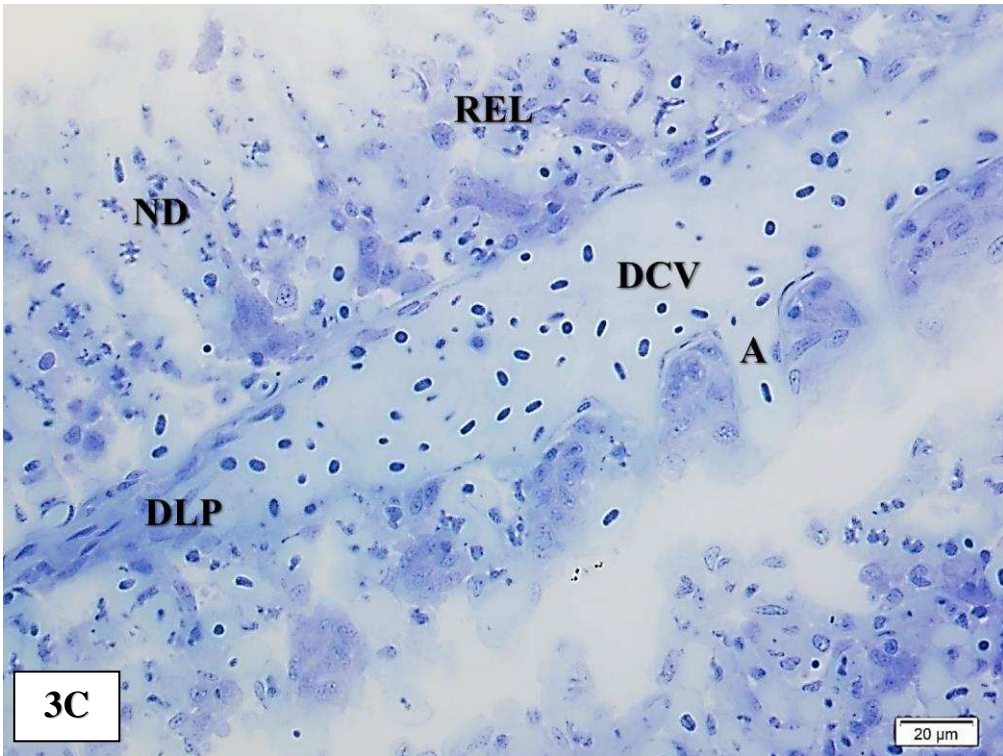
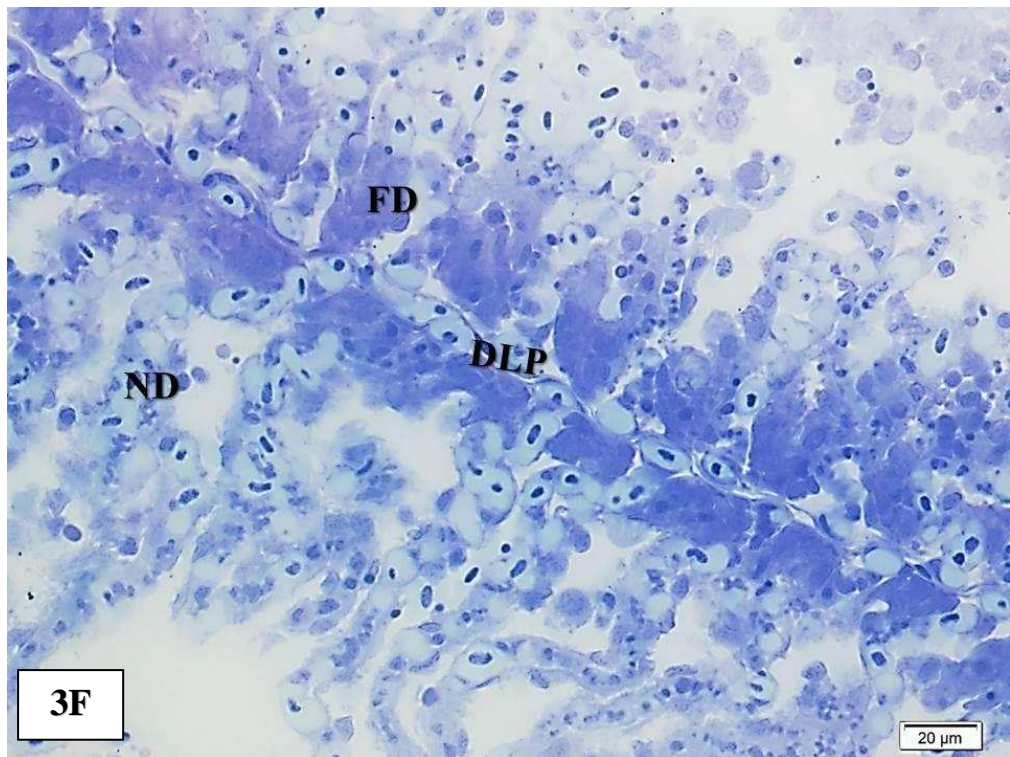
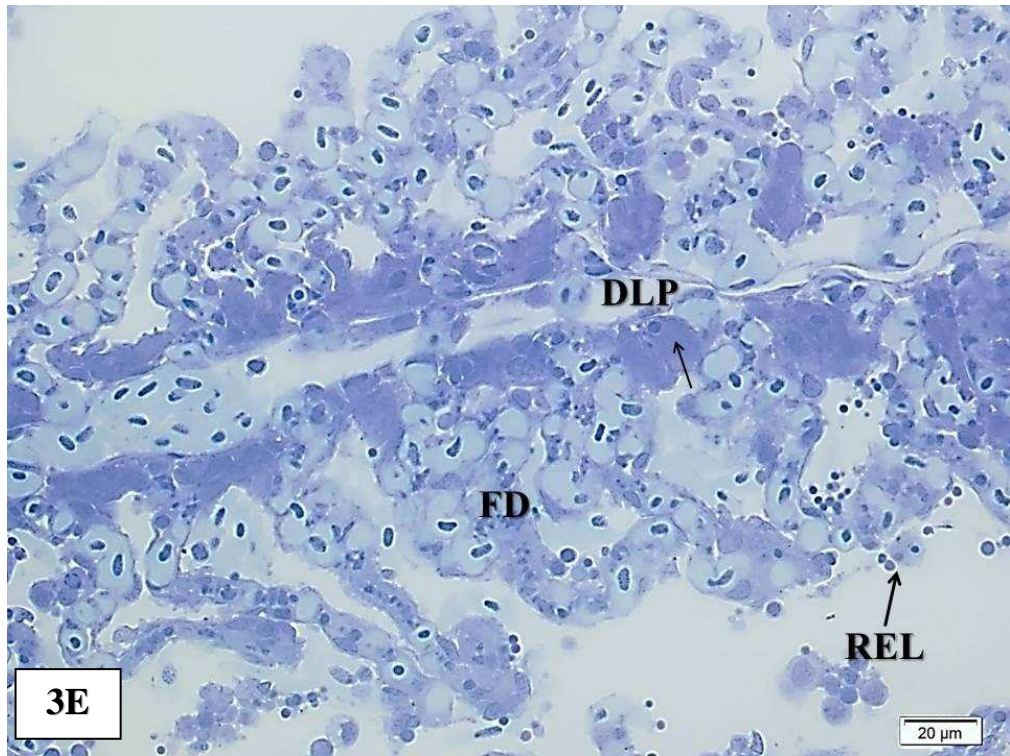


Figura 3E: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (20VitC⁻): (DLP) deformação das lamelas primárias; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 3F: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (20VitC⁺): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (ND) necrose e degenerações celulares; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .



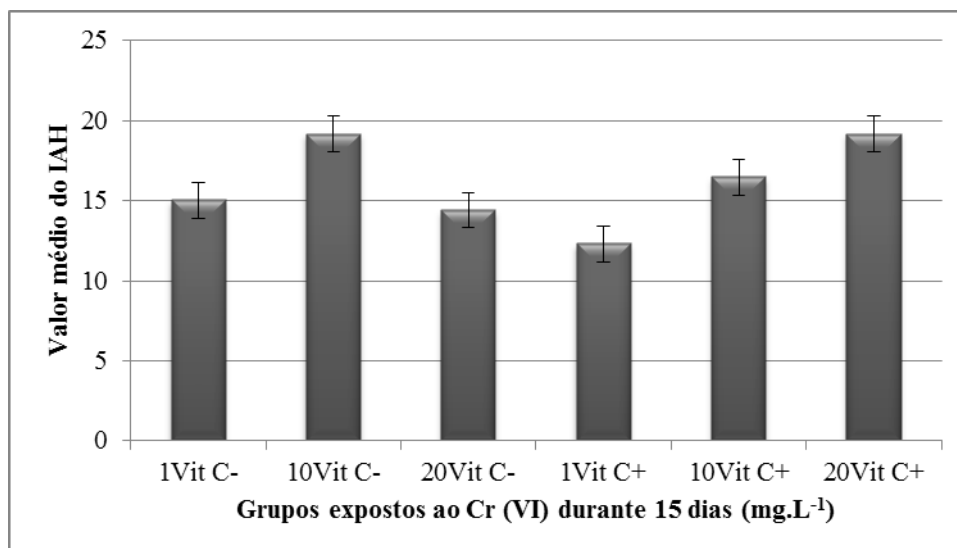


Figura 3G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias.

Figura 4A: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (1VitC⁻): (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamentar; (DLP) deformação da lamela primária. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 4B: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (1VitC⁺): (AEI) aumento do espaço interlamelar secundário; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (HTC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro; (DLP) deformação da lamela primária). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

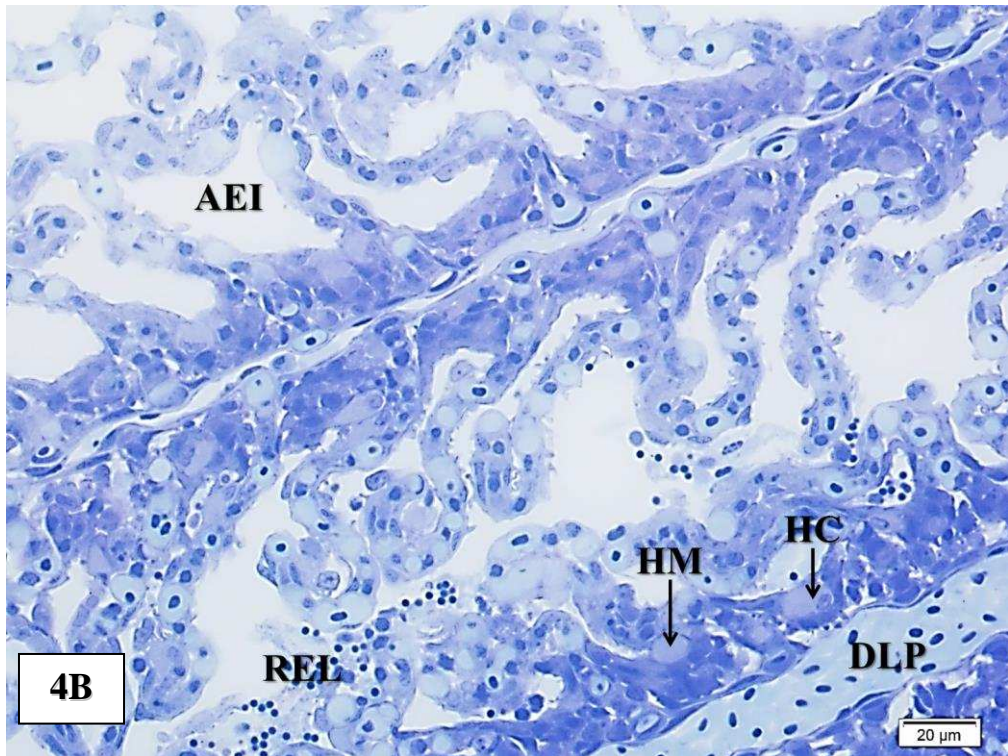
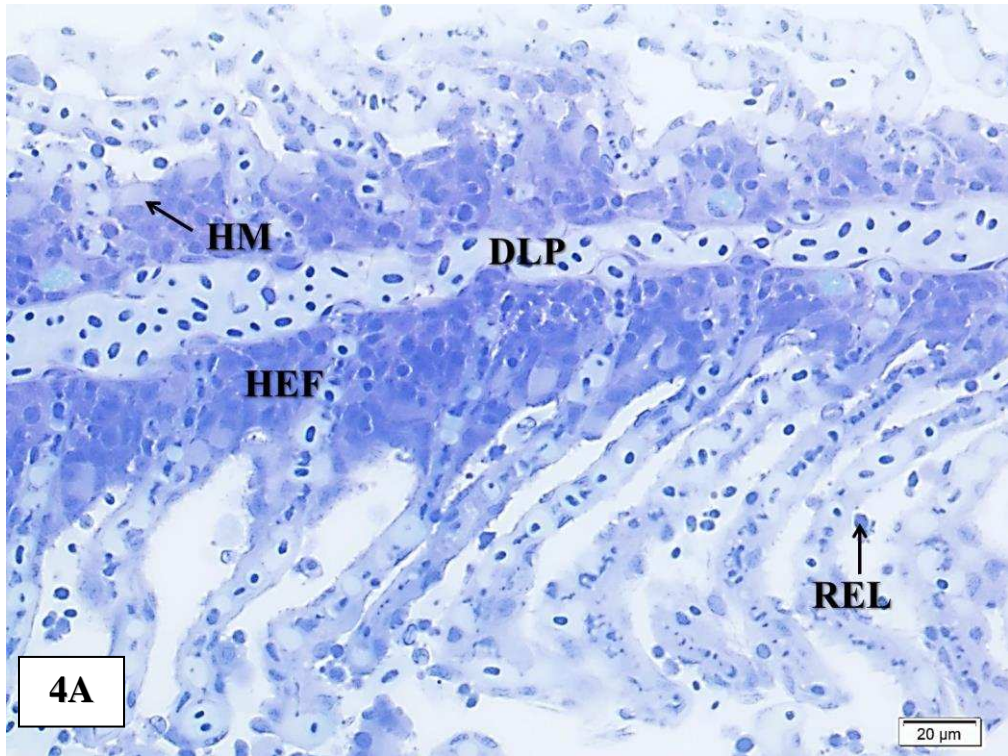


Figura 4C: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (10VitC⁻): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (VC) vacuolização degenerativa; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (REL) ruptura do epitélio lamelar; (DLP) deformação da lamela primária; (REIS) redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 4D: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (10VitC⁺): (DCV) dilatação dos canais vasculares; (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HEF) hipertrofias e hiperplasias do epitélio filamento; (HC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

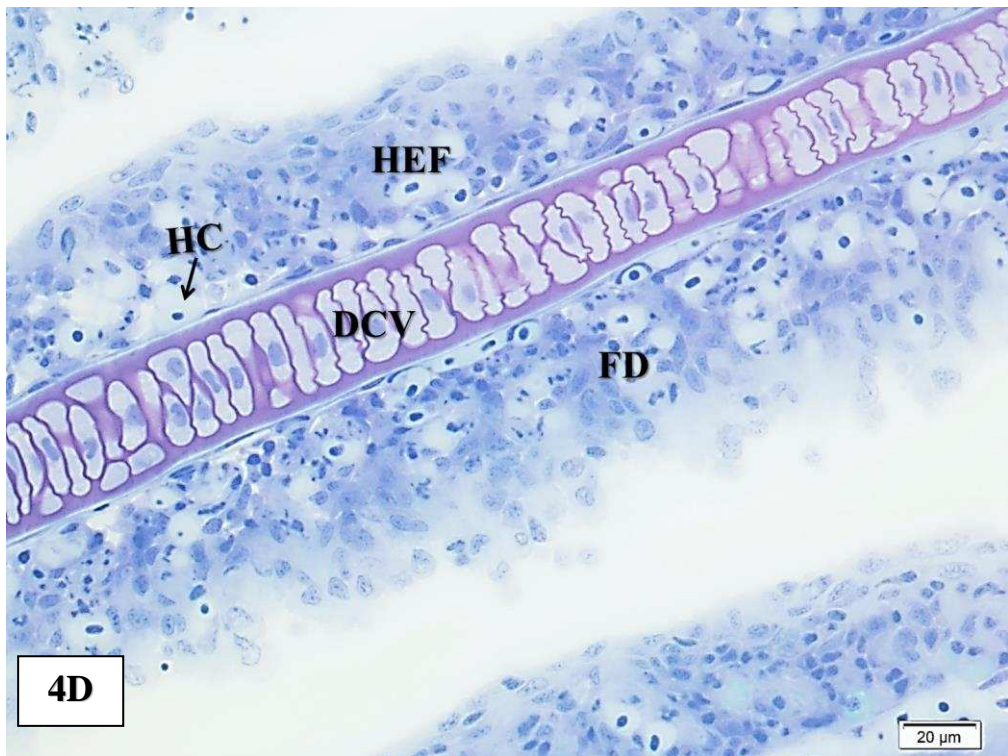
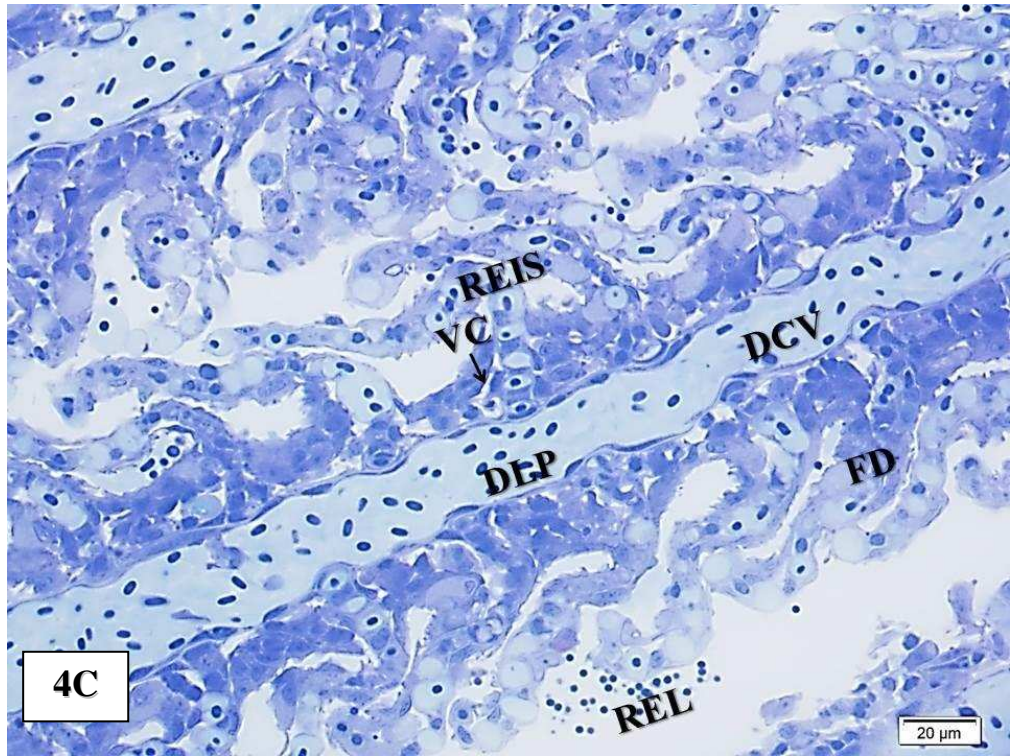
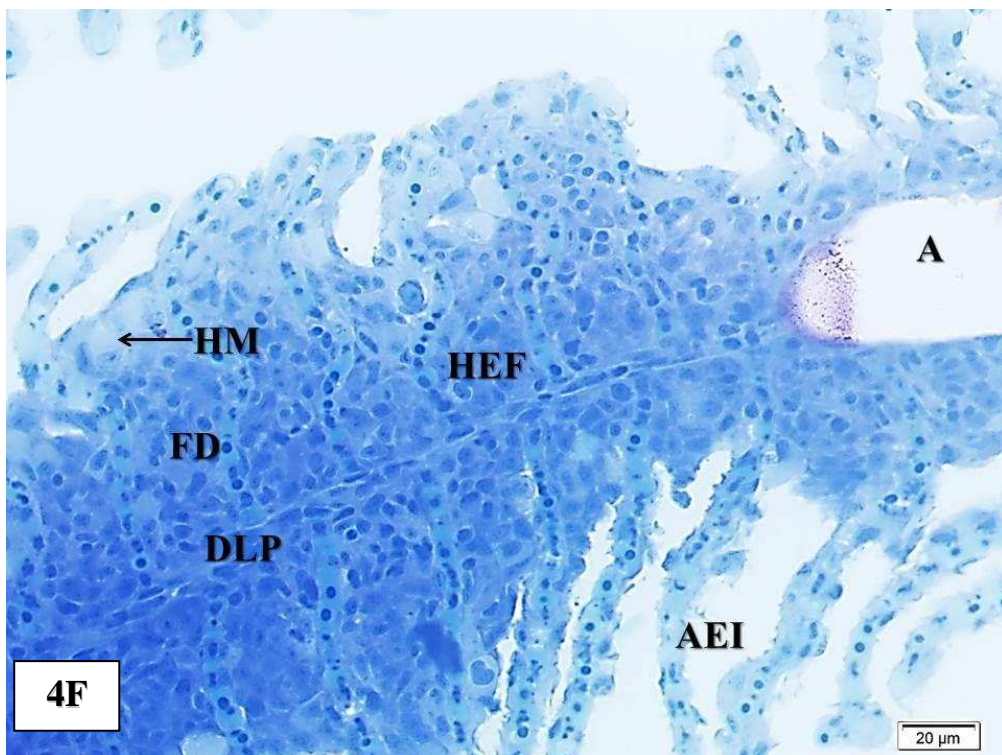
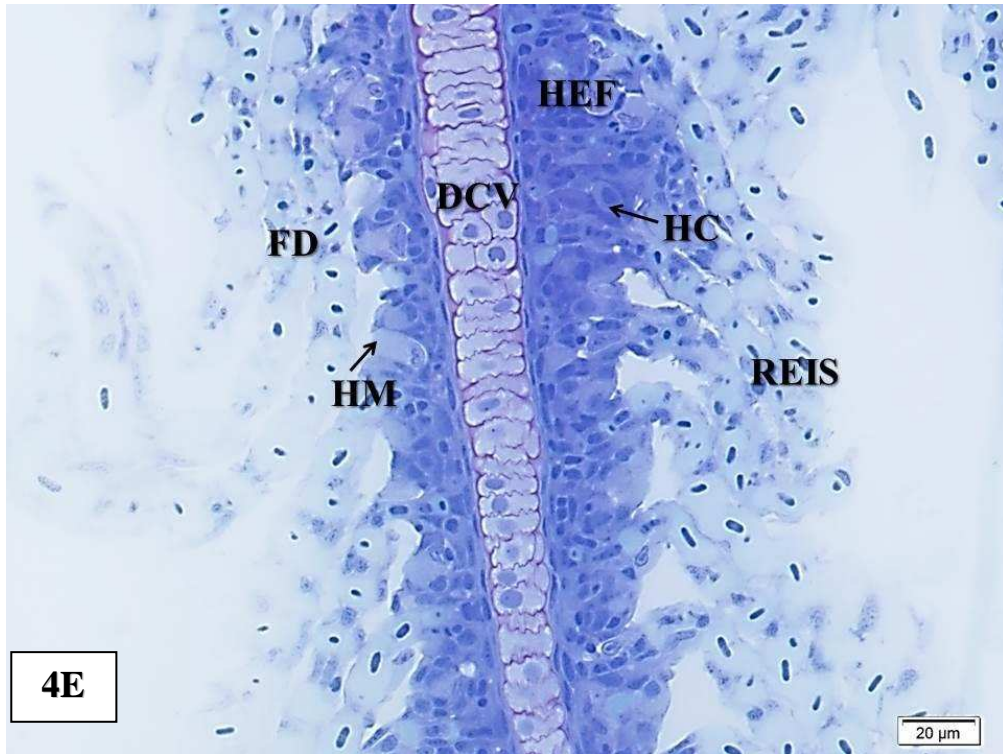


Figura 4E: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação com a vitamina C (20VitC⁻): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (DCV) dilatação dos canais venosos; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamentar; (HC) hipertrofia e hiperplasia das células de cloro; (REIS) redução do espaço interlamelar secundário. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 4F: Organização estrutural das brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} de Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação com a vitamina C (20VitC⁺): (FD) fusão e desorganização da lamela secundária; (HM) hipertrofia e hiperplasia das células mucosas; (DLP) deformação da lamela primária; (HEF) hipertrofia e hiperplasia do epitélio filamentar; (AEI) aumento do espaço interlamelar secundário; (A) aneurisma;. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .



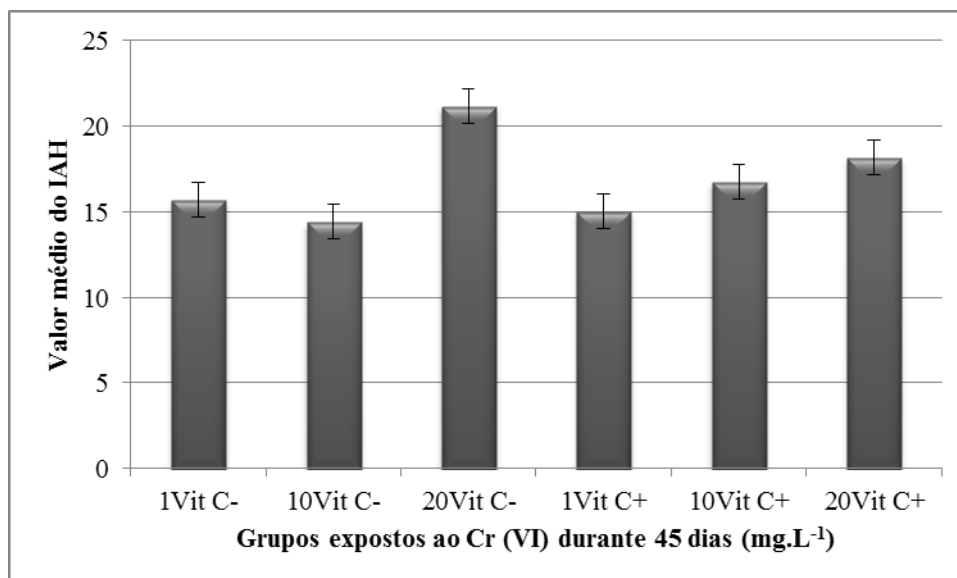


Figura 4G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) das brânquias de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45 dias.

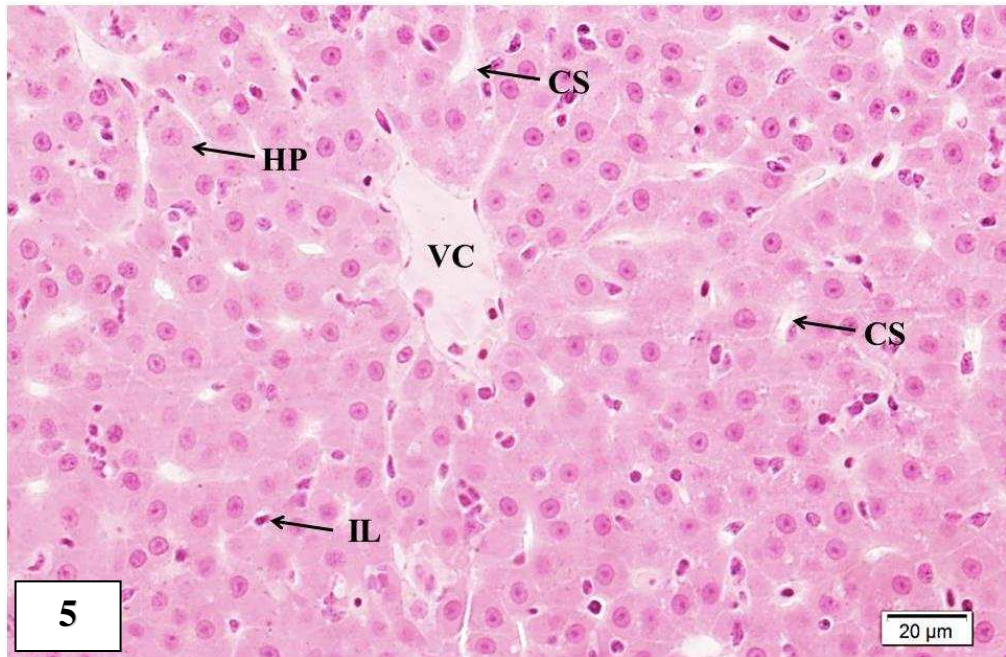


Figura 5: Organização histológica do tecido hepático de *Astyanax aff. bimaculatus* do Grupo Controle. Hepatócito (HP), capilar sinusoide (CS), infiltrado leucocitário (IL), veia cental (VC). Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm.

Figura 6A: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC⁻): (VH) vacuolização hepatocelular; (ND) necrose e degenerações de hepatócitos. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

Figura 6B: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC⁺): (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (VH) vacuolização hepatocelular. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

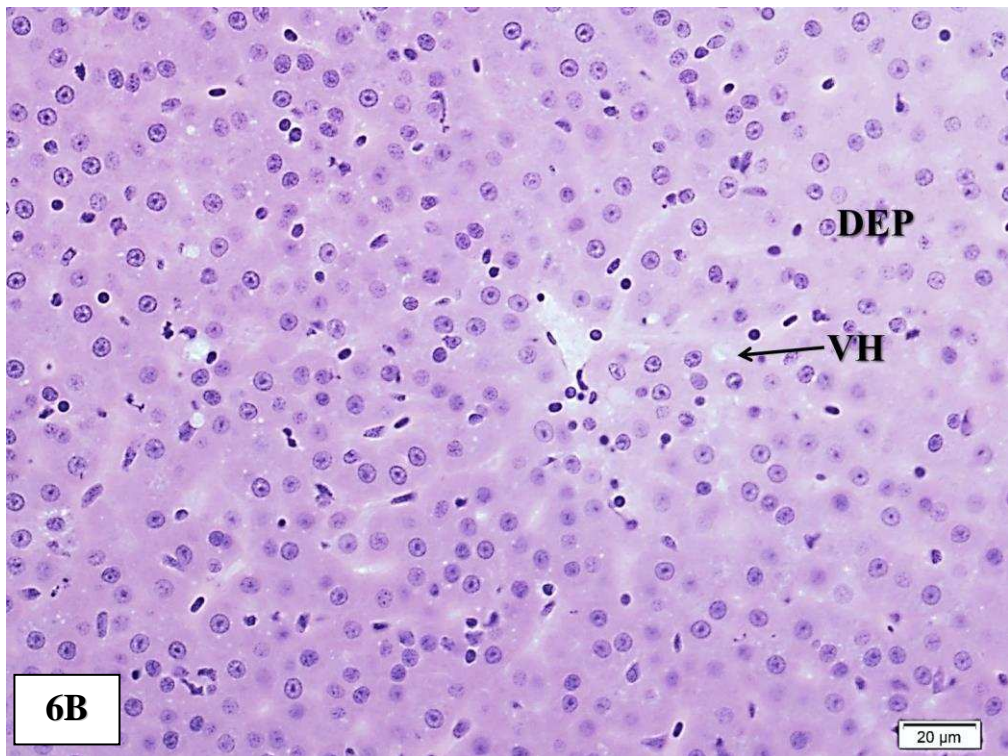
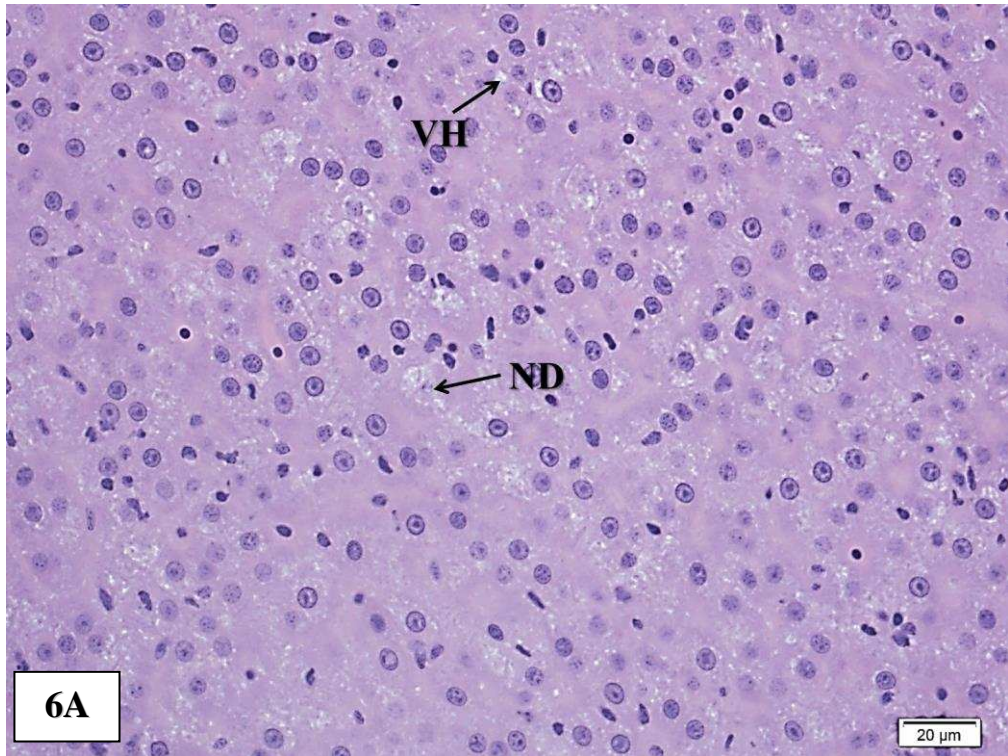


Figura 6C: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC^-): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (HH) hipertofia e hiperplasia de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: $20\ \mu\text{m}$.

Figura 6D: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC^+): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: $20\ \mu\text{m}$.

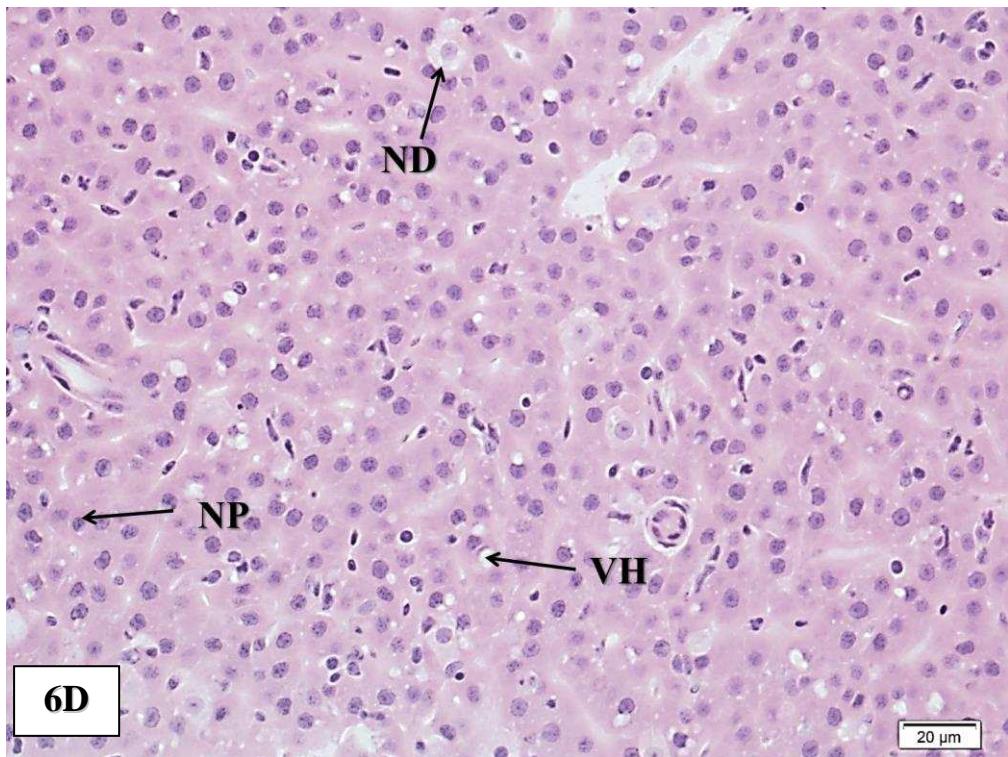
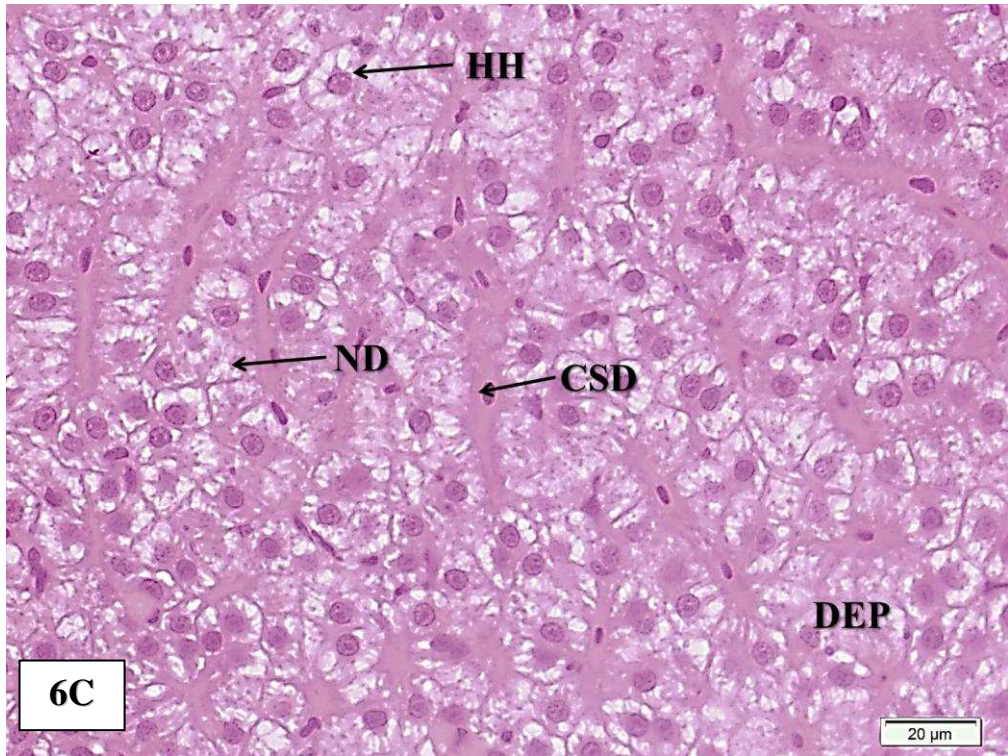
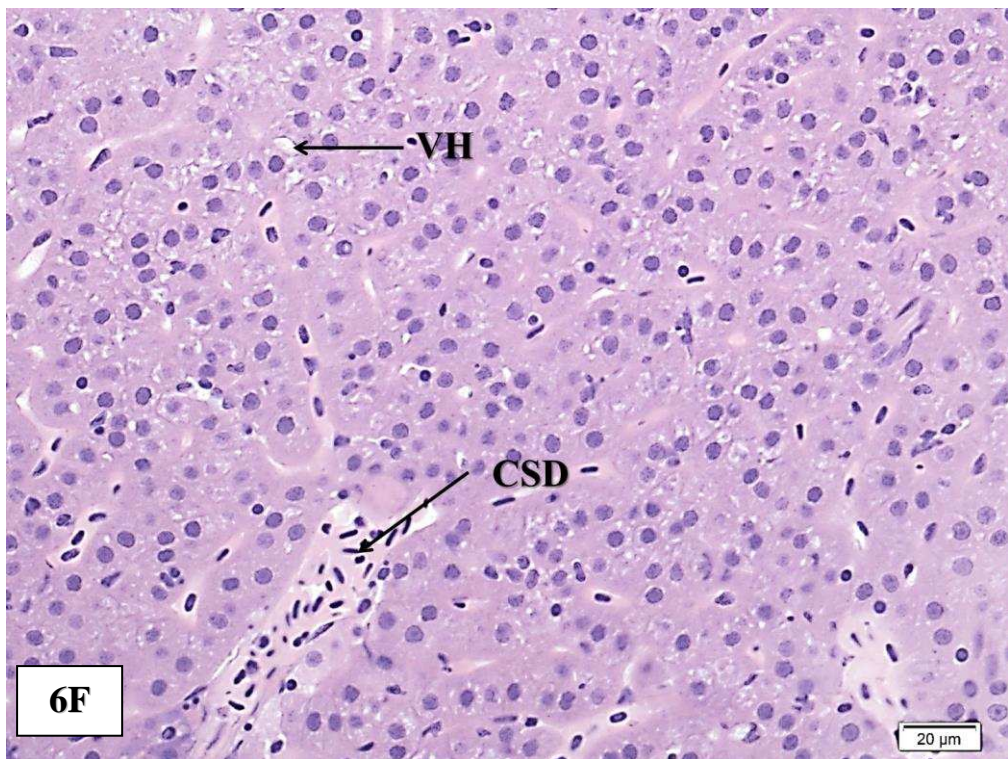
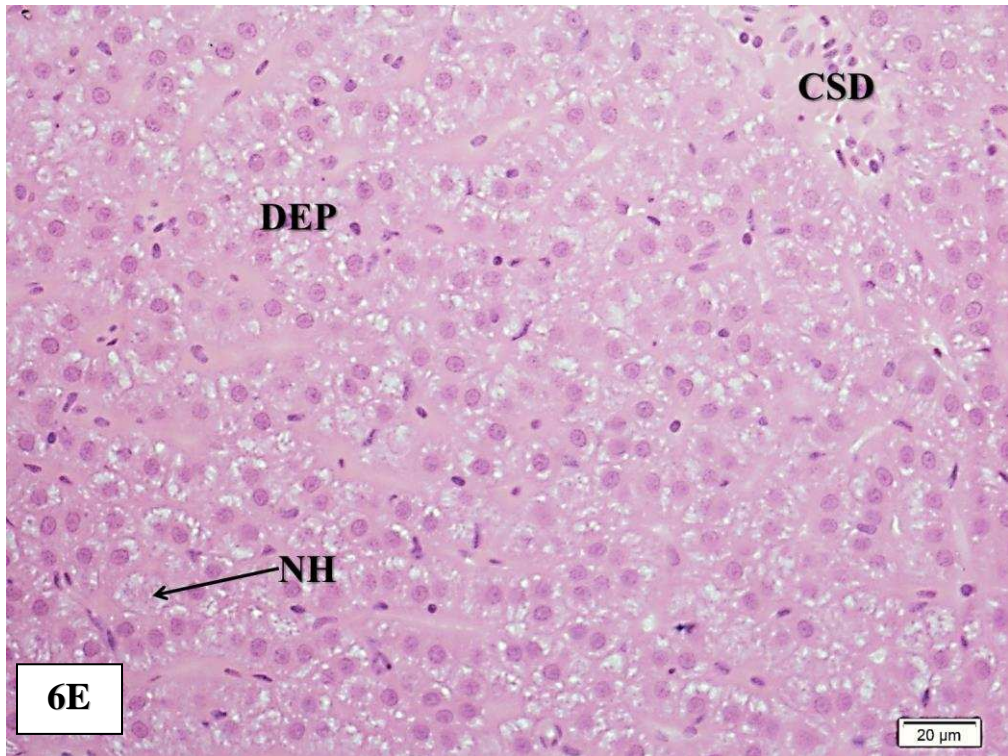


Figura 6E: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

Figura 6F: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .



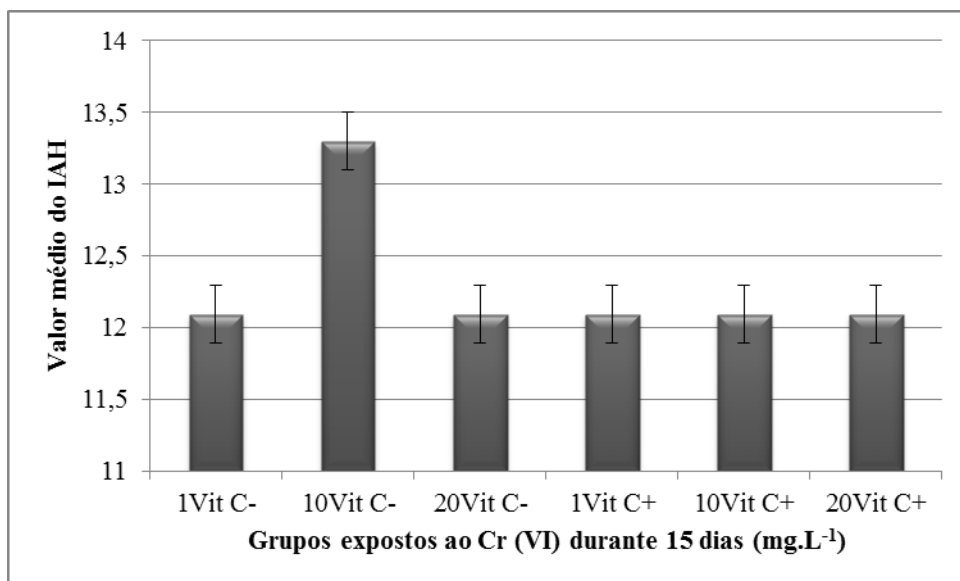


Figura 6G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias.

Figura 7A: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1Vit⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (CSD) congestão sanguínea e dilatação de sinusoide; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (IL) infiltrados leucocitários. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

Figura 7B: Organização histológica do fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1Vit⁺): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (IL) infiltrados leucocitários. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

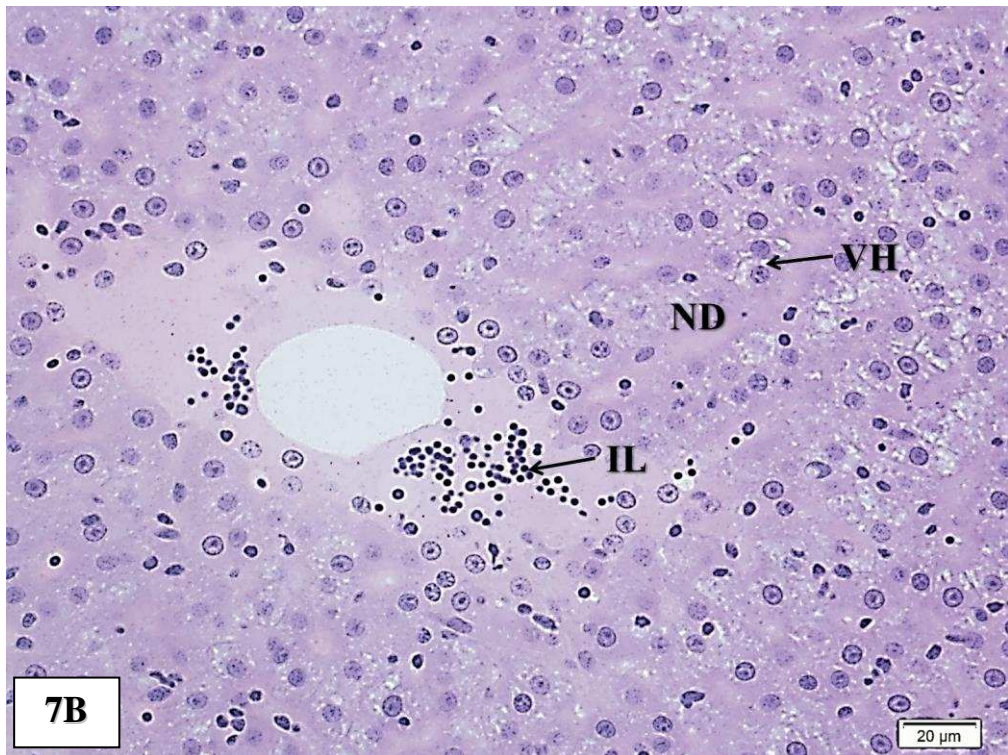
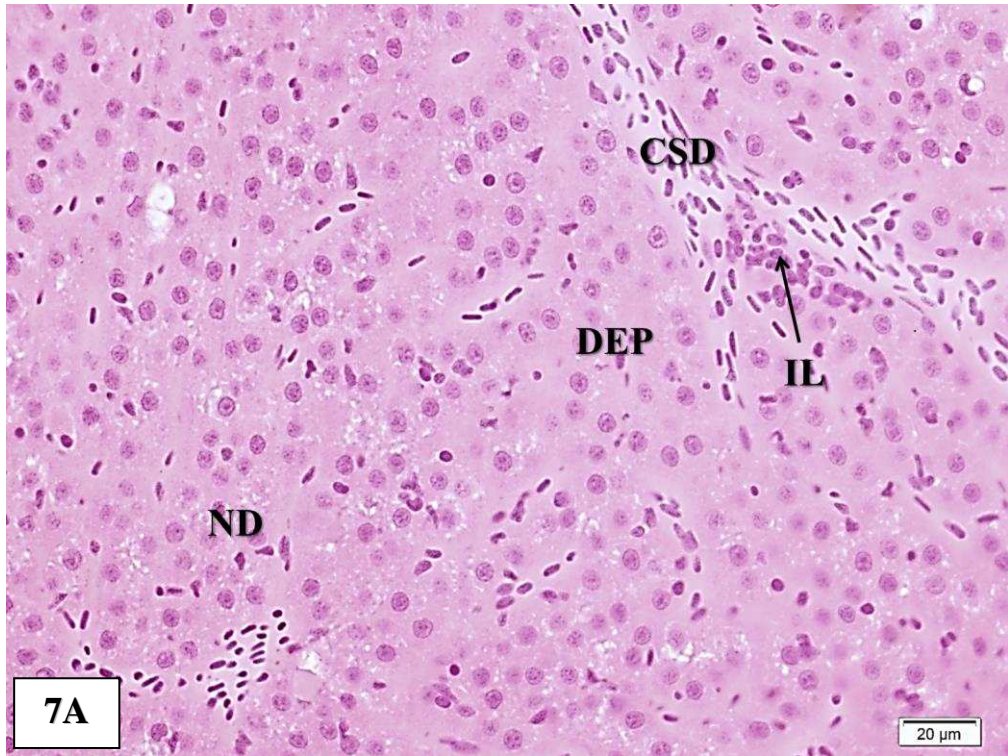


Figura 7C: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC^-): (VH) vacuolização hepatocelular; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: $20\ \mu\text{m}$.

Figura 7D: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC^+): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (NP) núcleo picnótico; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina.

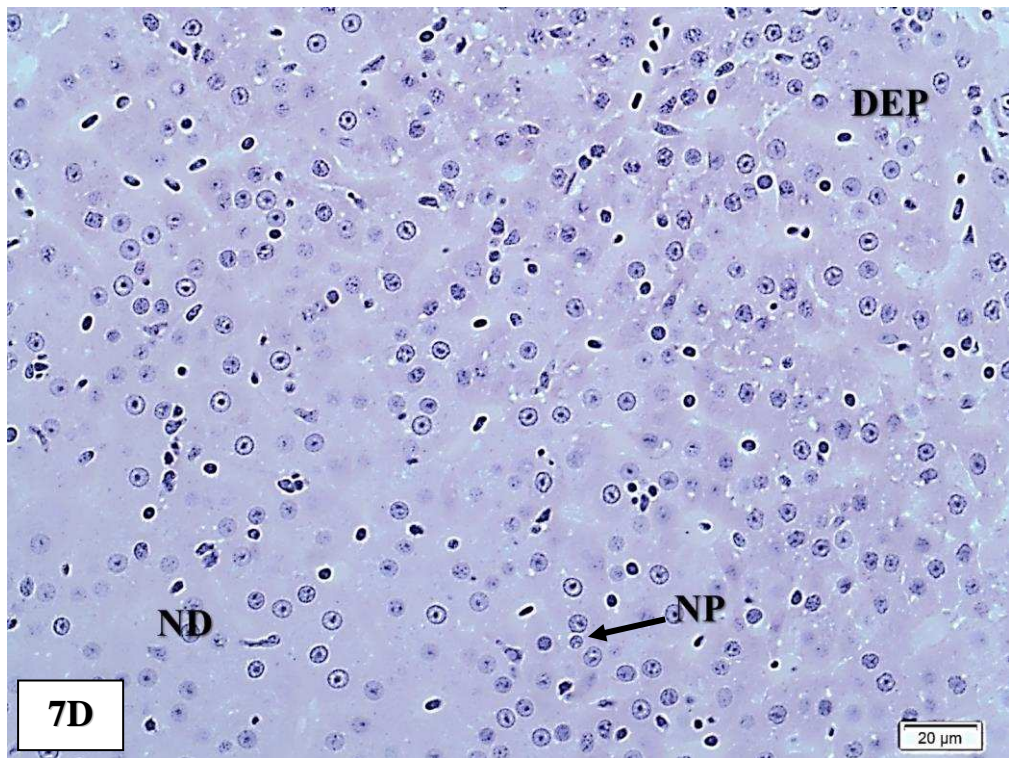
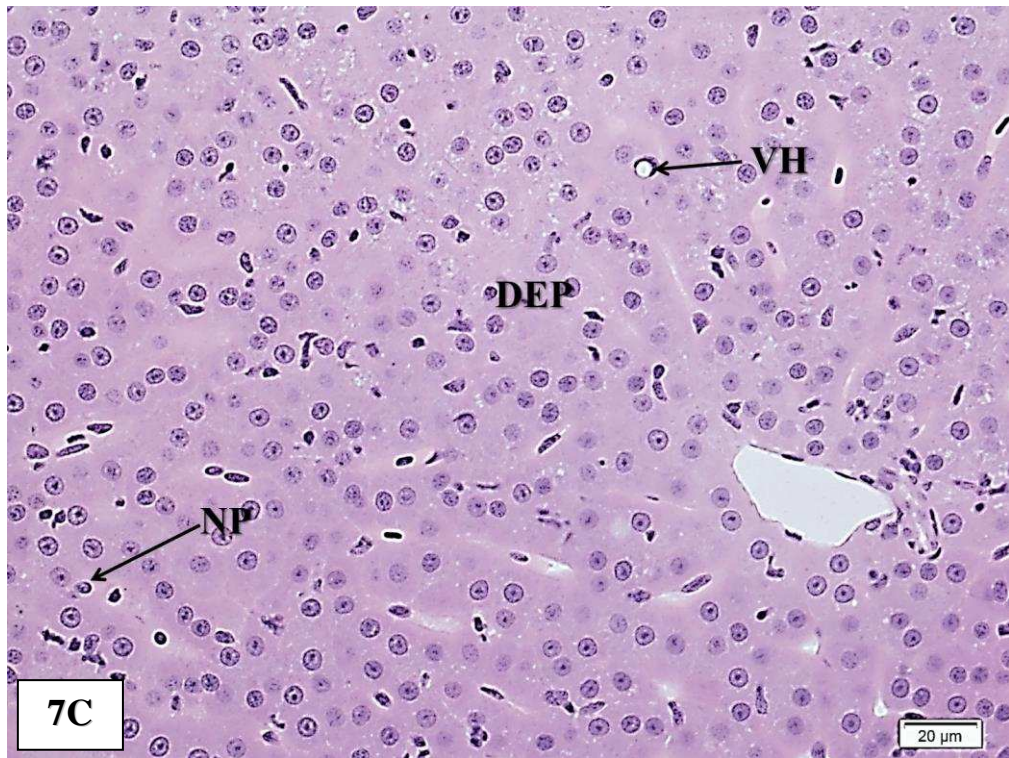
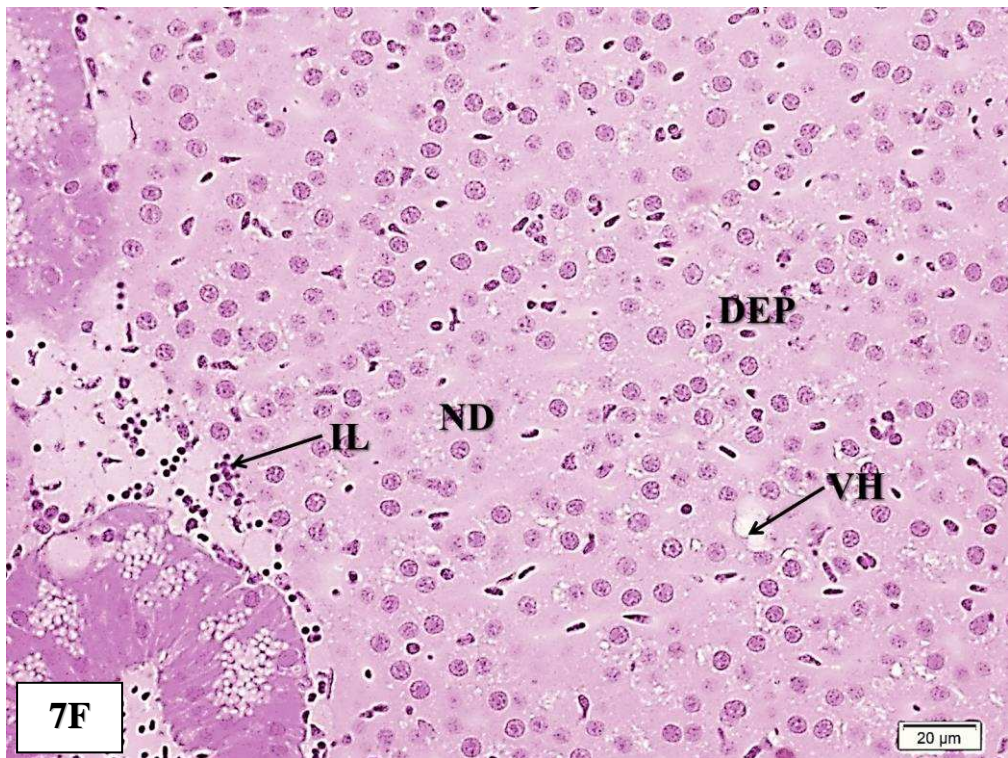
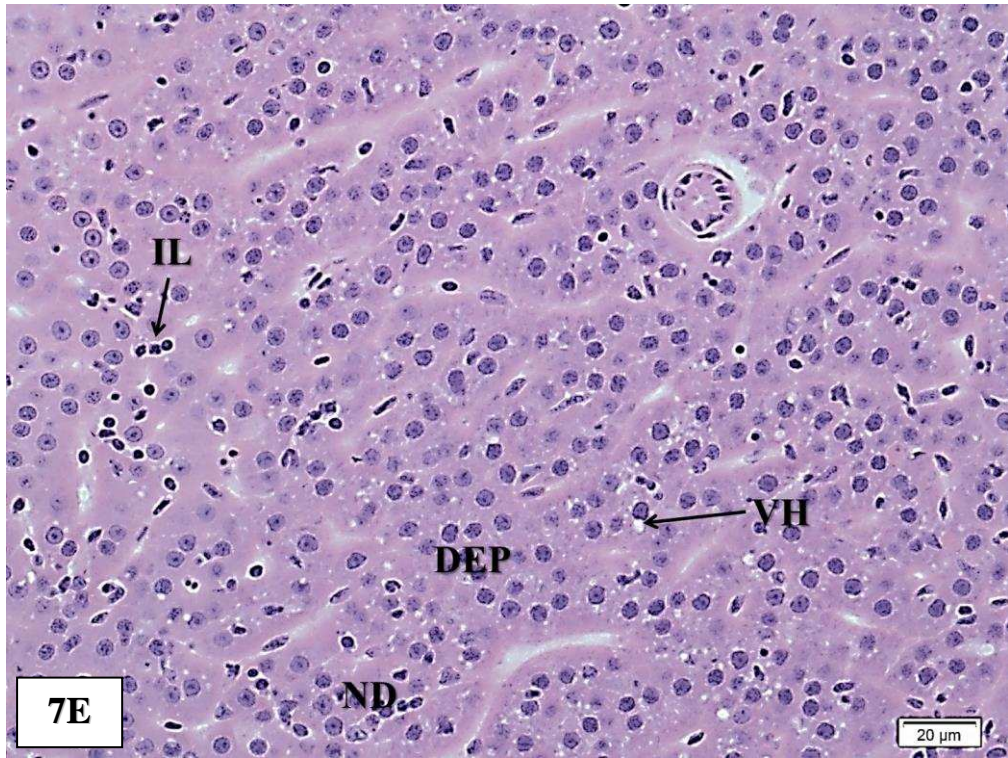


Figura 7E: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima; (VH) vacuolização hepatocelular; (IL) infiltrado leucocitário. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .

Figura 7F: Organização histológica do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (IL) infiltrado leucocitário; (ND) necrose e degenerações de hepatócitos; (VH) vacuolização hepatocelular; (DEP) desarranjo da estrutura do parênquima. Coloração: Hematoxilina de Mayer e Eosina. Barra: 20 μm .



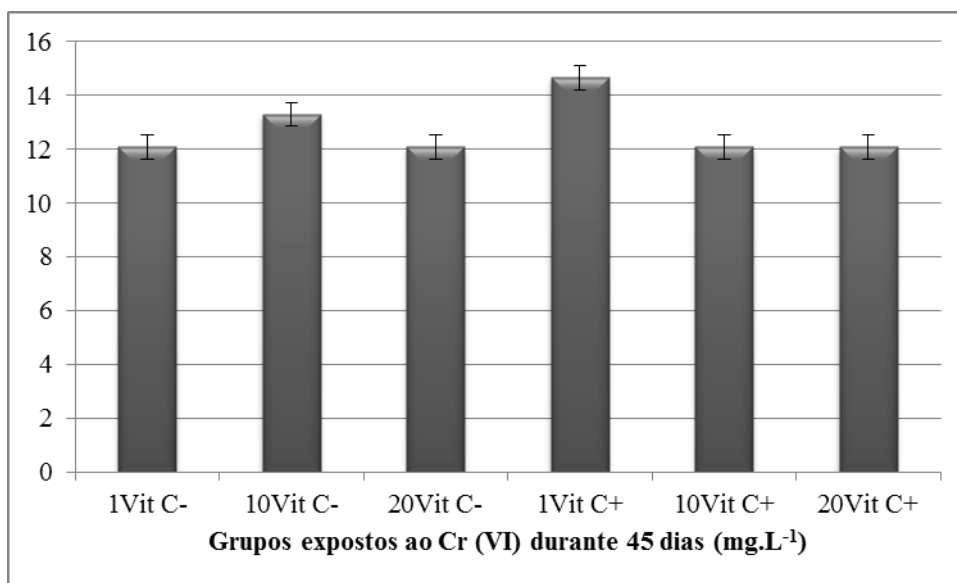


Figura 7G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) do fígado de *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45 dias.

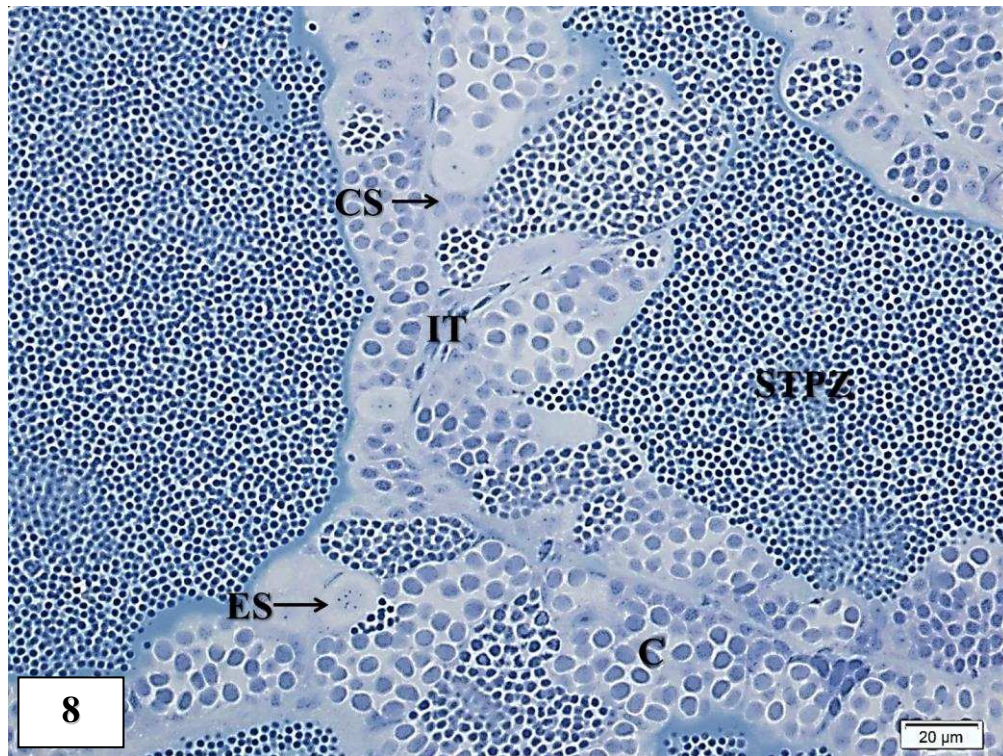


Figura 8: Organização histológica do tecido testicular de *Astyanax* aff. *bimaculatus* do Grupo Controle. Cistos (C), lúmen testicular contendo espermatozoides e fluido testicular (SPTZ), intertúbulo (IT), célula de Sertoli (CS), espermatogônias (ES). Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μ m.

Figura 9A: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC⁻): (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degenerações; (V) vacuolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 9B: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (V) vacúolos; (ND) necroses e degenerações. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

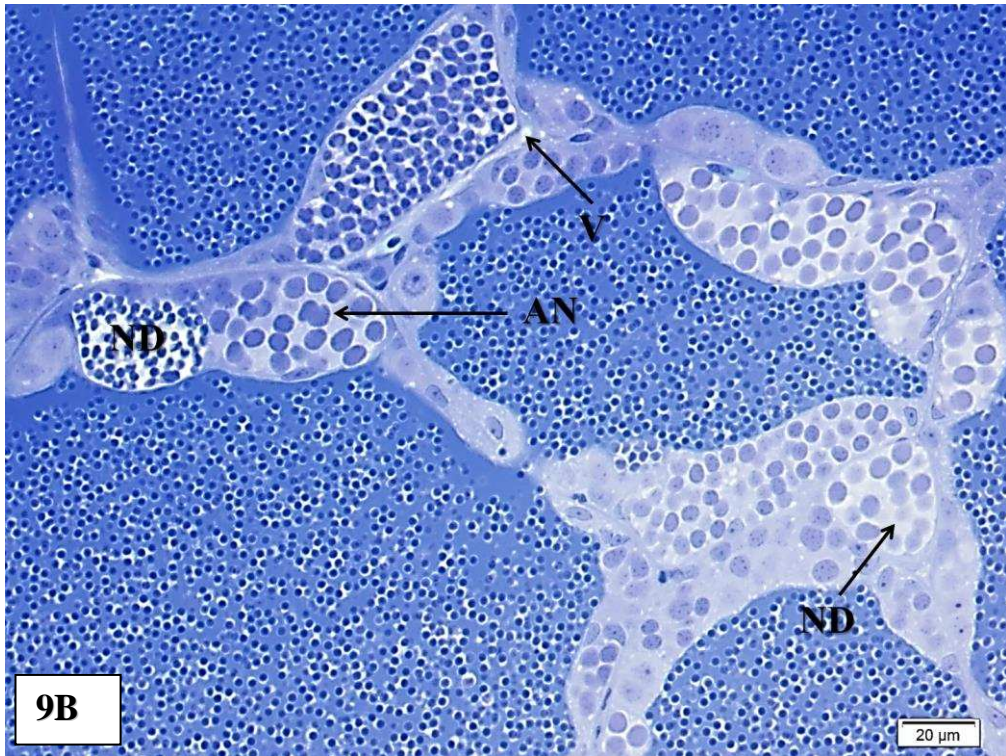
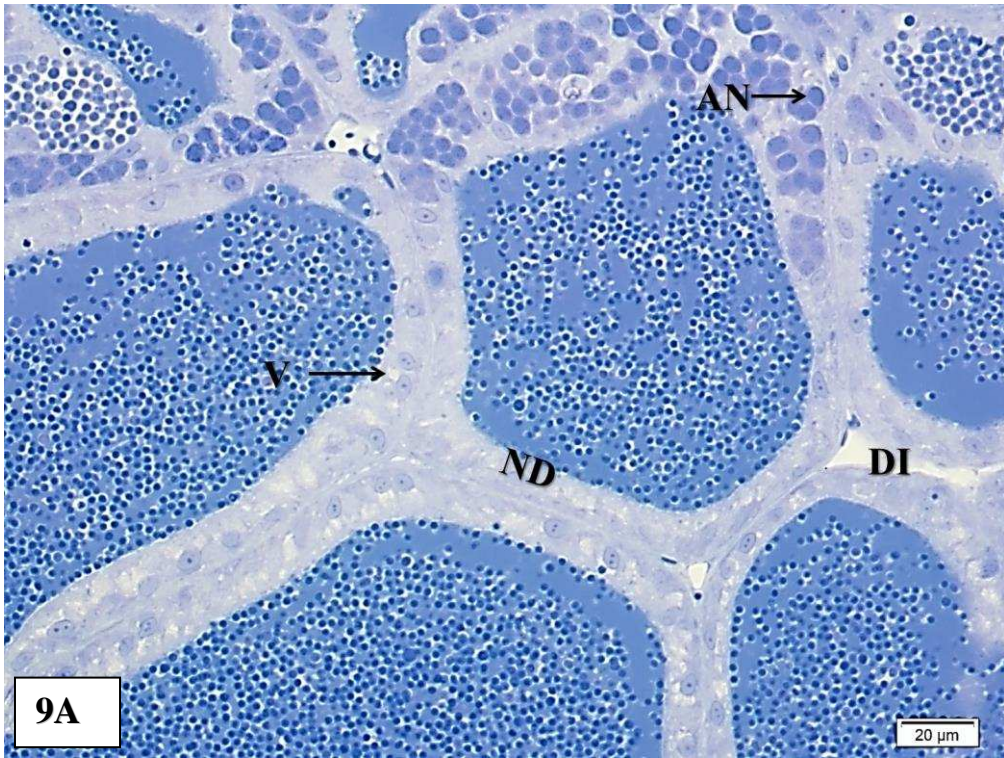


Figura 9C: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC⁻): (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degenerações; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 9D: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (ND) necroses e degenerações; (DI) dilatação intertubular; (NP) núcleo picnótico. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

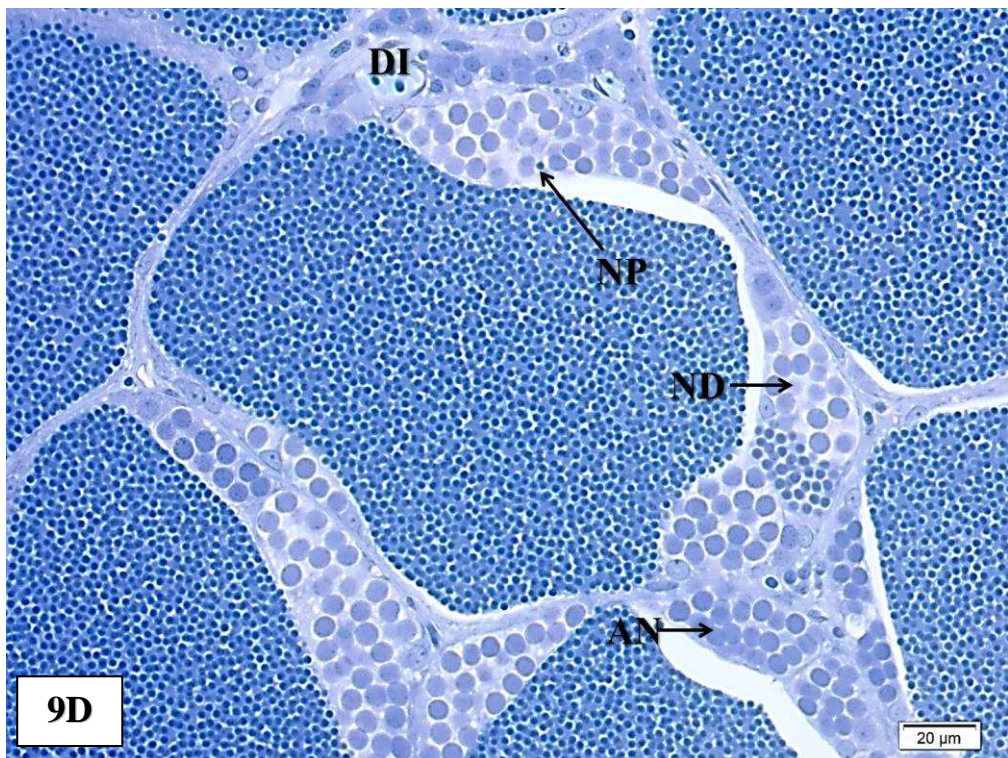
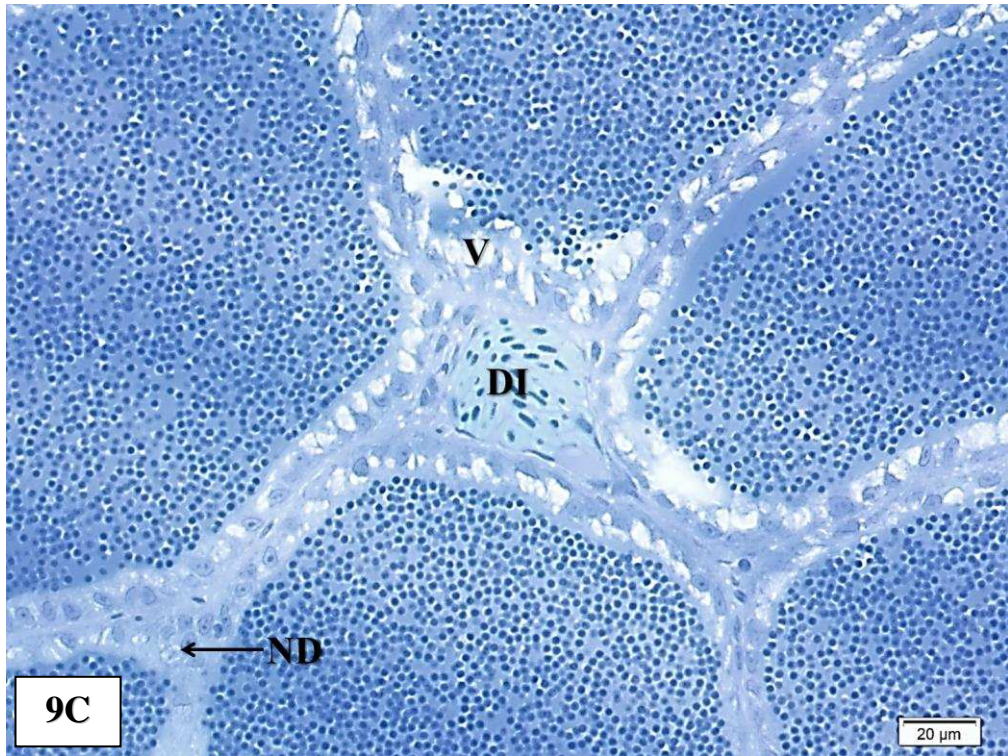
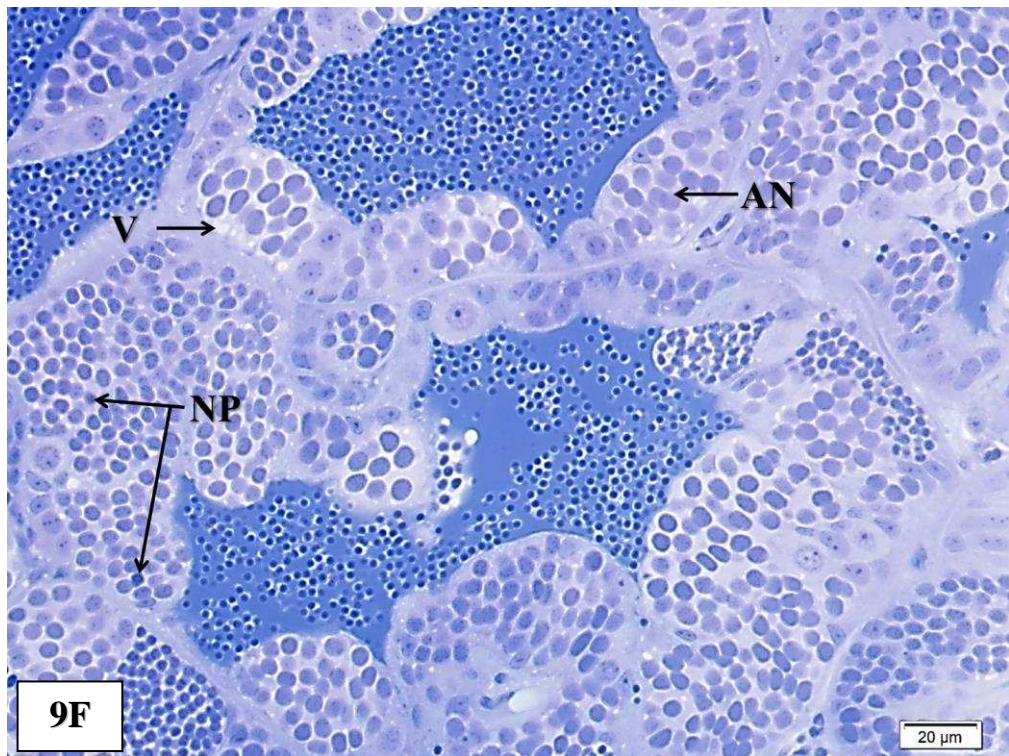
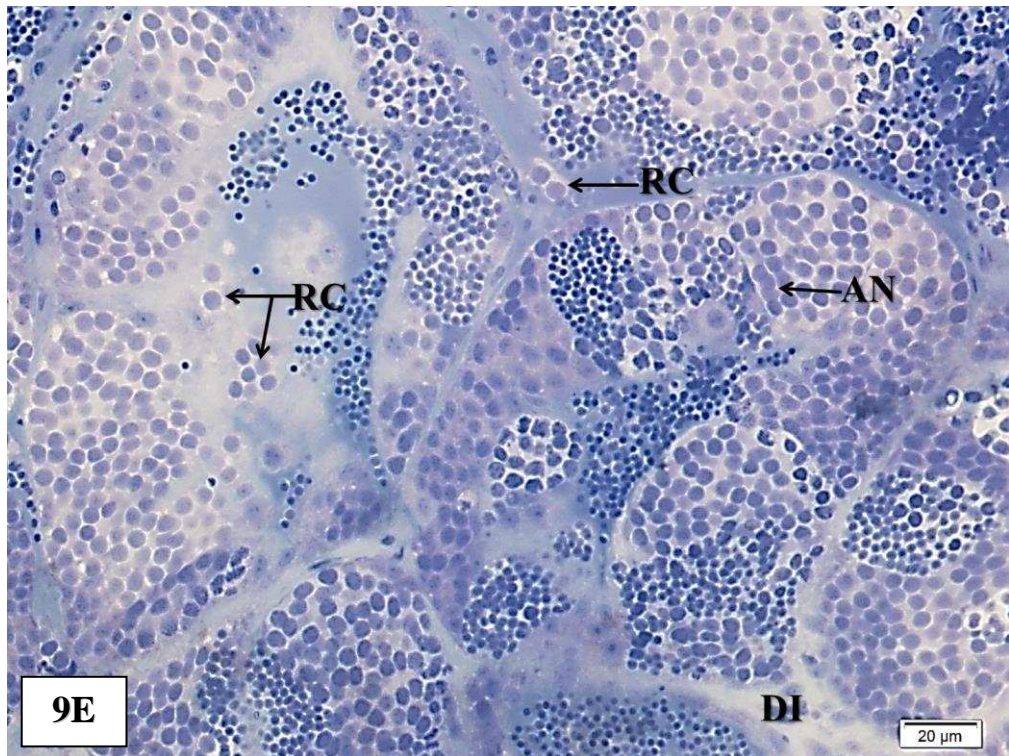


Figura 9E: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 9F: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 20mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 15 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .



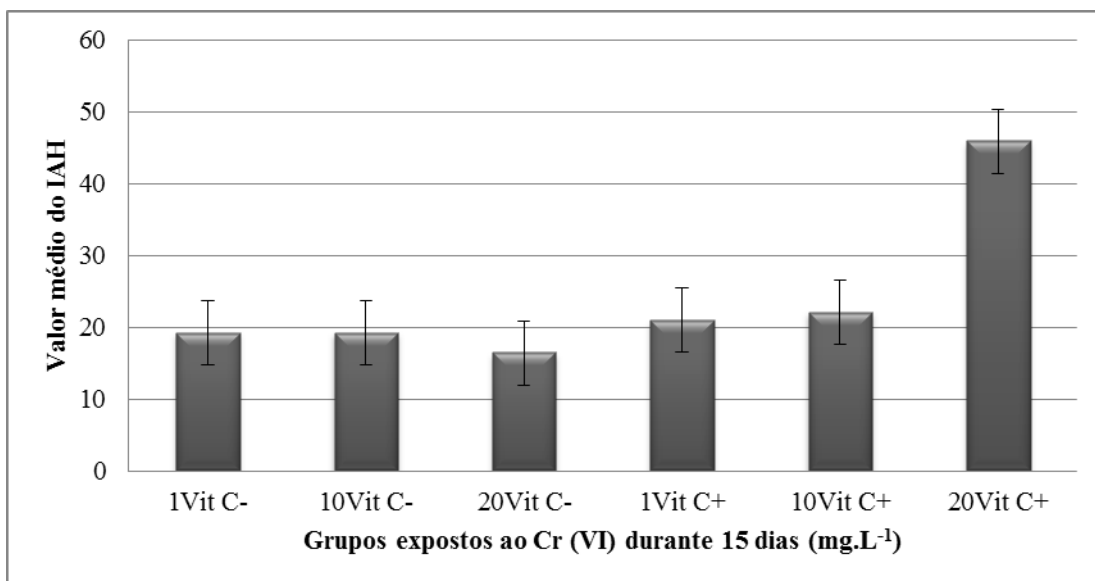


Figura 9G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 15 dias.

Figura 10A: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (1VitC⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 10B: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 1mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (1VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

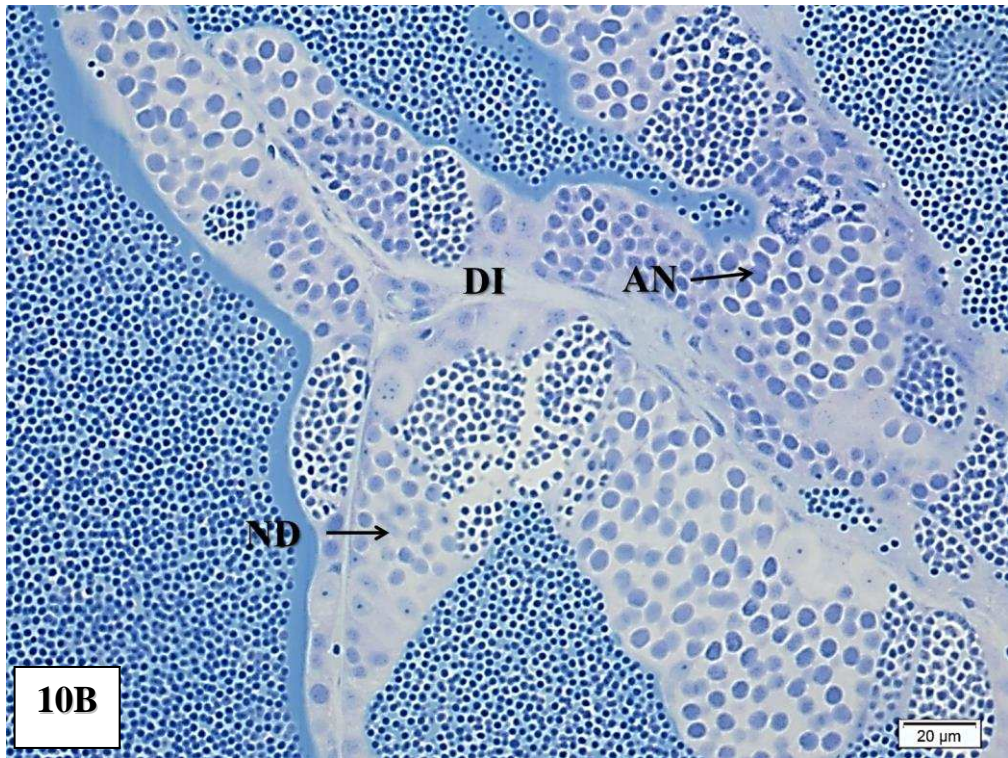
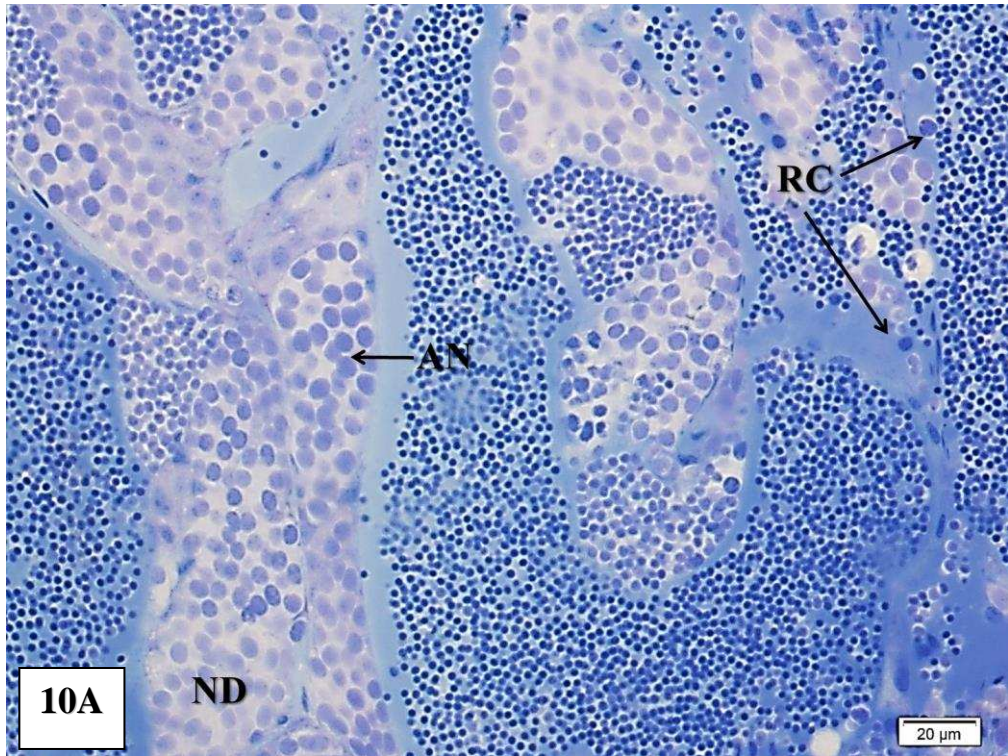


Figura 10C: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (10VitC⁻): (ND) necrose e degennerações; (AN) agrupamento nuclear; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 10D: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a 10mg.L^{-1} Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (10VitC⁺): (DI) dilatação intertubular; (ND) necroses e degennerações. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

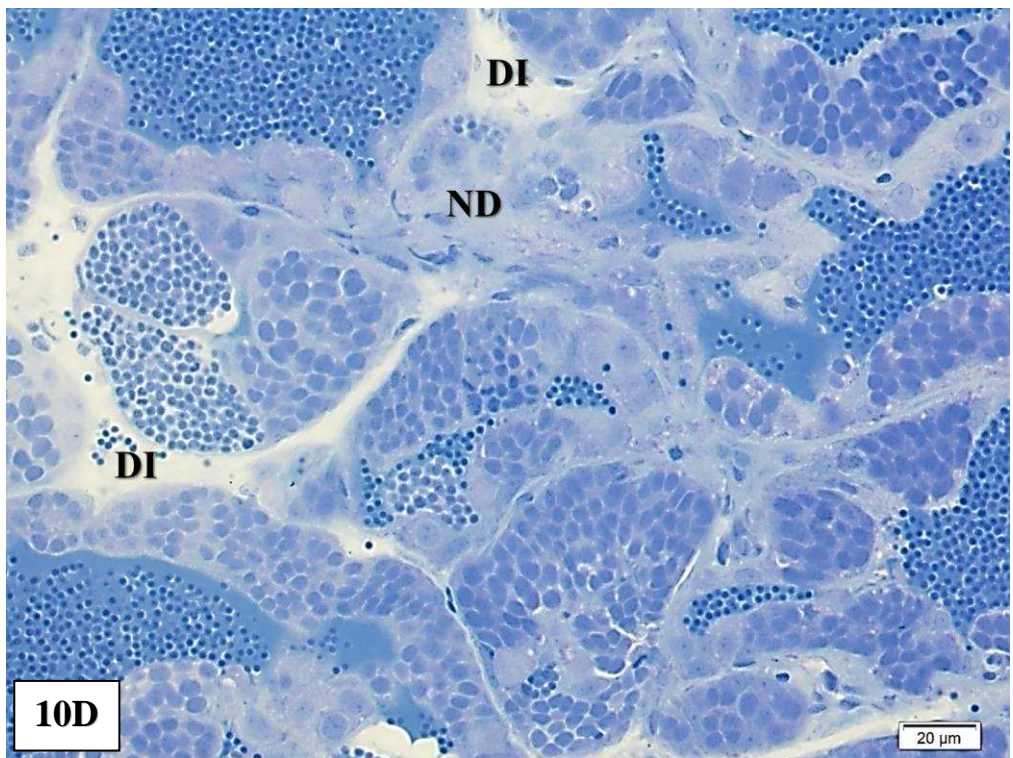
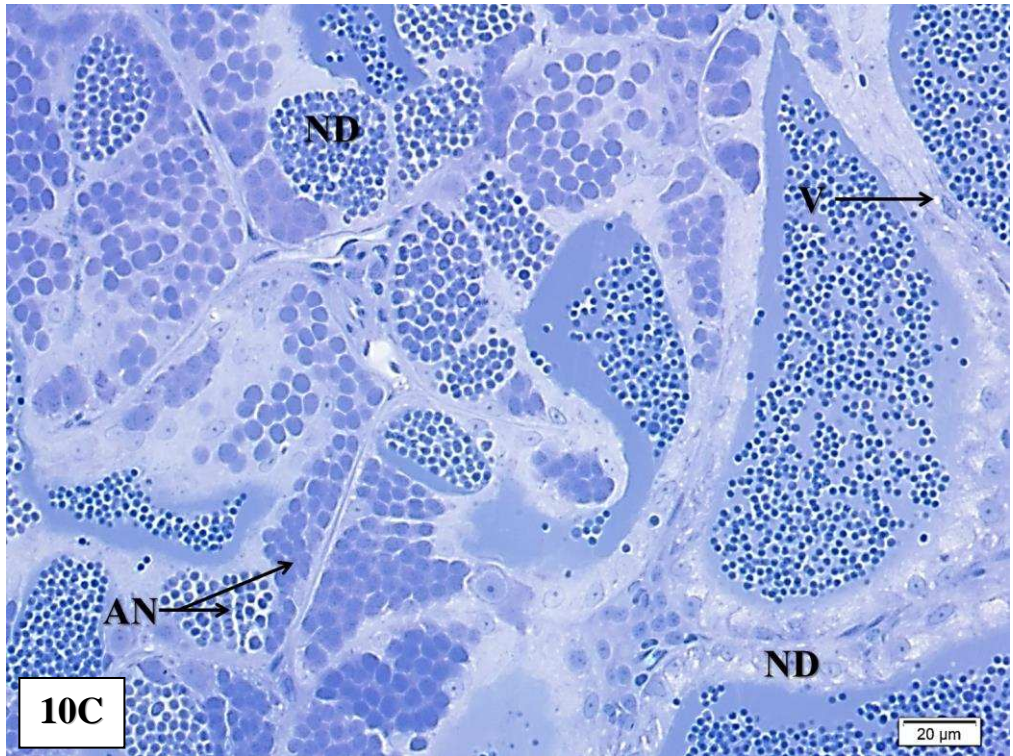
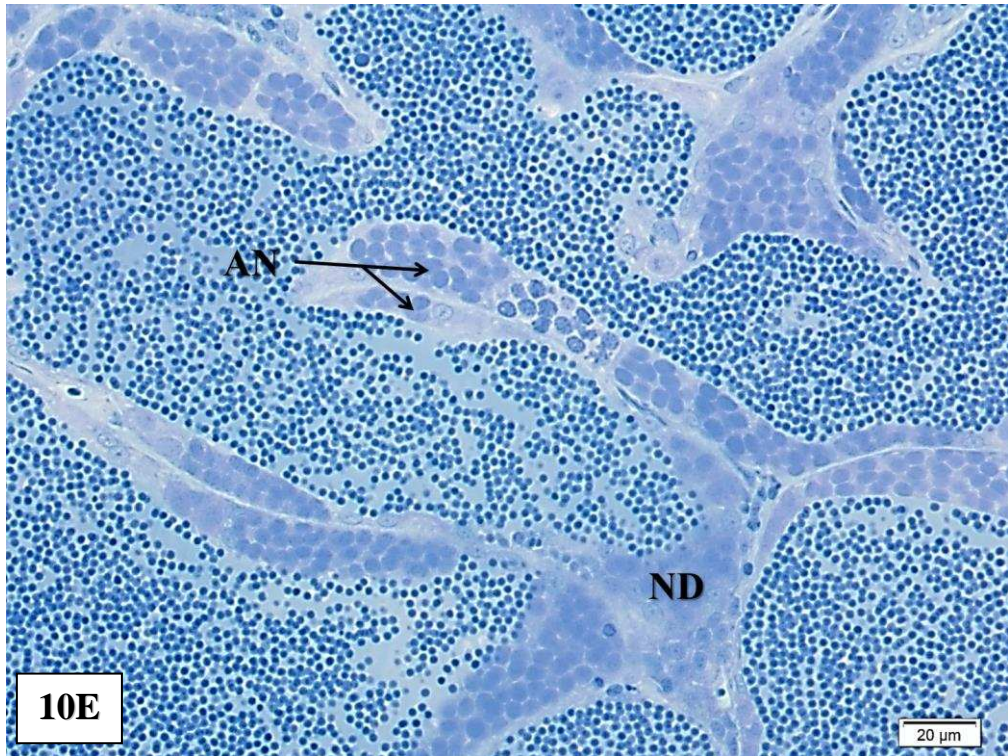


Figura 10E: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento sem suplementação da vitamina C (20VitC⁻): (RC) ruptura de cistos; (AN) agrupamento nuclear; (DI) dilatação intertubular. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .

Figura 10F: Organização histológica dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr (VI) na água, após 45 dias de tratamento com suplementação da vitamina C (20VitC⁺): (AN) agrupamento nuclear; (NP) núcleo picnótico; (V) vacúolos. Coloração: Azul de toluidina e Borato de sódio 1 %. Barra: 20 μm .



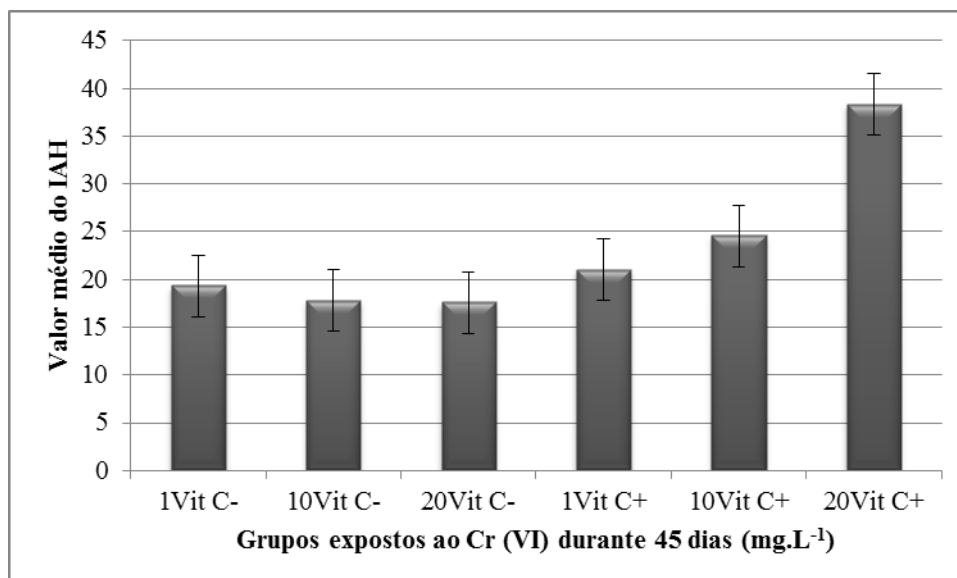


Figura 10G: Valor médio do Índice de Alterações Histológicas (IAH) dos testículos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a ração suplementada com vitamina C, durante 45 dias.

Tabela 11: Constituição do tecido branquial e quantificação de células em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.

	CONSTITUIÇÃO TECIDUAL	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
		C	1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺
EXPERIMENTO 1	Células pavimentosas	1,3±0,45 ^a	8,14±1,06 ^a	17,9±1,34 ^a	4,3±1,45 ^a	3,3±1,41 ^a	46,7±3,63 ^b	3,8±0,35 ^a
	Células mucosas	1,5±0,87 ^a	0,74±0,42 ^a	11,5±2,10 ^b	6,26±4,55 ^c	2±0,16 ^a	6,11±3,47 ^c	7,2±3,89 ^c
	Células pilar	1,90±0,22 ^{ac}	0,54±0,28 ^a	9,90±3,52 ^b	3,20±1,35 ^{ac}	2,00±0,07 ^a	5,44±1,22 ^c	4,5±0,79 ^c
	Eritrócitos	10,1±0,72 ^{ac}	9,38±0,49 ^{ac}	13,5±1,84 ^{ad}	4,36±0,61 ^c	10±0,97 ^{ac}	23,05±4,76 ^b	4,05±0,35 ^c
	Epitélio filamentar	33,00±1,69 ^a	40,64±1,83 ^a	69,18±0,93 ^a	31,93±1,53 ^a	34,50±2,57 ^a	49,16±2,03 ^a	28,95±2,07 ^a
	Lamela secundária	54,8±1,07 ^a	22,04±4,21 ^b	69,18±0,93 ^{ac}	53,66±1,84 ^{ac}	50,5±1,33 ^{ac}	79,38±2,16 ^c	50,95±1,90 ^{ac}
	Eixo venoso central	6,5±1,41 ^a	47,5±2,18 ^{bd}	81±3,76 ^c	22,4±2,79 ^{ad}	7,5±1,76 ^a	69,55±2,55 ^{bc}	31,15±1,96 ^{ad}
EXPERIMENTO 2	Células pavimentosas	1,30±0,06 ^a	8,15±1,58 ^b	17,90±4,12 ^c	10,4±3,65 ^d	7,75±1,89 ^b	24,53±5,21 ^e	3,35±0,31 ^f
	Células mucosas	1,50±0,87 ^a	0,10±0,08 ^a	11,5±4,61 ^b	10,2±1,45 ^a	0,15±0,56 ^a	23,50±6,61 ^c	6,55±2,40 ^d
	Células pilar	1,90±0,22 ^{ac}	0,35±0,12 ^a	9,90±2,96 ^b	11,3±0,53 ^a	2,00±1,16 ^c	20,51±3,02 ^d	3,44±0,08 ^e
	Eritrócitos	10,10±2,72 ^{ac}	8,85±2,54 ^{ac}	13,5±1,90 ^a	11,3±0,51 ^b	12,50±0,94 ^{ac}	11,50±1,79 ^{ac}	2,75±0,27 ^{bc}
	Epitélio filamentar	33,00±3,69 ^a	34,10±3,00 ^a	69,18±6,57 ^b	40,5±5,97 ^c	31,20±2,98 ^a	64,03±6,97 ^b	34,00±2,75 ^a
	Lamela secundária	54,80±5,07 ^a	18,85±1,51 ^b	69,18±7,31 ^c	43,2±2,41 ^d	37,50±3,21 ^e	99,00±7,02 ^f	57,30±5,04 ^a
	Eixo venoso central	6,50±1,41 ^{ad}	46,50±3,88 ^b	81,00±5,25 ^c	51,2±2,31 ^{ad}	7,00±1,29 ^{ad}	59,90±3,03 ^b	23,05±3,07 ^d

Tabela 12: Constituição do tecido hepático e quantificação de células em *Astyanax* aff. *bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.

	CONSTITUIÇÃO TECIDUAL	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
		C	1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺
EXPERIMENTO	Citoplasma	129,8±0,46 ^a	201,5±4,03 ^b	146,87±0,66 ^a	139,63±1,03 ^a	148,5±1,12 ^a	99,2±0,66 ^a	118±0,51 ^a
	Hepatócito mononucleado	6,1±1,52 ^a	26,25±4,33 ^b	40,1±6,67 ^c	60,63±9,71 ^d	6,15±1,89 ^a	10,16±1,44 ^a	2,25±0,30 ^a
	Hepatócito binucleado	3,1±1,71 ^a	1,1±0,38 ^a	4,5±1,25 ^a	5,53±1,87 ^a	41,65±3,99 ^b	33,53±3,18 ^b	80,35±5,06 ^c
	Infiltrado leucocitário	3,9±0,86 ^a	6,1±1,75 ^a	12,83±1,67 ^a	22,9±9,47 ^b	12,3±1,99 ^a	7,4±1,76 ^a	11,5±1,63 ^a
	Capilar sinusoide	7,9±0,74 ^a	14,45±0,24 ^a	21,43±1,05 ^a	23,56±1,81 ^a	54,65±4,85 ^b	76,93±8,28 ^c	9,9±0,99 ^a
	Diâmetro de hepatócitos	1,8±0,10 ^a	1,2±0,12 ^a	1,6±0,64 ^a	4,7±0,21 ^b	1,2±0,12 ^a	5,5±0,19 ^c	4,7±0,21 ^b
EXPERIMENTO	Citoplasma	129,8±0,46 ^a	175,05±4,19 ^b	127,9±0,90 ^a	152,3±0,43 ^a	148,5±0,67 ^a	94,94±0,48 ^c	187,4±2,99 ^b
	Hepatócito mononucleado	6,1±1,52 ^a	38±3,63 ^b	41,2±3,28 ^b	3,8±0,71 ^a	6,1±0,99 ^a	8,25±1,75 ^a	1,91±0,38 ^a
	Hepatócito binucleado	3,1±1,71 ^a	3,05±1,28 ^a	5,4±0,90 ^a	6,4±1,87 ^a	41,6±4,23 ^b	33,6±4,96 ^b	53,75±4,44 ^b
	Infiltrado leucocitário	3,9±2,86 ^a	5,8±1,39 ^{ab}	16,6±1,51 ^{bc}	19±3,47 ^c	12,3±3,51 ^{abc}	11,35±3,01 ^{abc}	15,95±1,57 ^{bc}
	Capilar sinusoide	7,9±0,74 ^a	18,55±2,14 ^b	23,75±4,56 ^c	15,2±3,81 ^b	54,65±6,31 ^d	70,25±7,22 ^e	8,39±1,24 ^a
	Diâmetro de hepatócitos	1,8±0,16 ^a	1,1±0,16 ^b	1,4±0,16 ^b	5,1±0,32 ^c	1,3±0,11 ^{ab}	8,2±0,45 ^d	4,2±0,32 ^e

Tabela 13: Constituição do tecido testicular e quantificação de células em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associados ou não a dieta suplementada com vitamina C durante 15 e 45 dias.

	CONSTITUIÇÃO TECIDUAL	CONCENTRAÇÃO DE Cr (VI) (mg.L ⁻¹)						
		C	1VitC ⁻	10VitC ⁻	20VitC ⁻	1VitC ⁺	10VitC ⁺	20VitC ⁺
EXPERIMENTO 1	Cistos	104,2±4,76 ^a	114,05±4,10 ^a	58,26±3,71 ^a	106,8±4,33 ^a	155,6±3,59 ^a	105,07±4,36 ^a	121,1±4,00 ^a
	Intertúbulo	2,2±1,15 ^a	25,9±4,34 ^b	12,33±2,74 ^{ab}	2,23±1,73 ^a	20,9±2,30 ^{ab}	6,4±1,06 ^a	17,0±2,08 ^{ab}
	Espermatogônias	1,4±0,55 ^a	1,55±1,26 ^a	29,9±4,76 ^b	2,00±0,98 ^a	3,75±0,34 ^a	2,3±0,64 ^a	39,7±6,68 ^d
	Células de Sertoli	1,2±0,27 ^a	13,4±0,38 ^b	2,33±0,56 ^a	1,00±0,86 ^a	20,9±1,99 ^c	0,9±0,23 ^a	3,7±0,96 ^a
	Fluido testicular	0,7±0,10 ^a	40,3±3,82 ^{bd}	106,17±4,80 ^c	0,66±0,30 ^a	27,45±1,21 ^b	29,06±5,62 ^b	54,3±3,14 ^d
	Espermatozoide	50,9±5,52 ^a	70,8±5,28 ^a	54,36±5,01 ^a	63,7±6,05 ^a	76,3±6,18 ^a	122,37±5,90 ^a	30,2±5,12 ^a
EXPERIMENTO 2	Cistos	104,2±4,76 ^a	39,75±2,27 ^b	39,35±3,12 ^b	24,95±2,01 ^b	41,4±3,03 ^b	23,5±2,59 ^b	11,1±2,74 ^b
	Intertúbulo	2,2±0,15 ^a	7,5±1,12 ^b	12,2±2,31 ^c	9,3±1,19 ^b	52,8±4,25 ^d	38,2±5,04 ^e	12,5±2,69 ^c
	Espermatogônias	1,4±0,55 ^a	1,4±0,32 ^{ac}	16,5±6,87 ^b	16,6±6,06 ^b	3,8±1,04 ^{cd}	1,8±0,75 ^{ac}	3,75±1,22 ^d
	Células de Sertoli	1,2±0,27 ^a	8,3±1,59 ^b	1,8±0,53 ^a	0,3±0,48 ^a	1,9±0,23 ^a	2,6±0,42 ^a	0,2±0,06 ^a
	Fluido testicular	0,7±1,10 ^a	39,2±6,29 ^b	127,7±4,65 ^c	135,5±5,57 ^c	107,6±7,09 ^d	123,2±5,07 ^c	182,35±8,33 ^e
	Espermatozoide	50,9±2,52 ^a	169,8±4,19 ^b	66,6±2,07 ^a	79,35±3,96 ^a	59,0±3,54 ^a	73,8±3,02 ^a	41,6±2,24 ^a

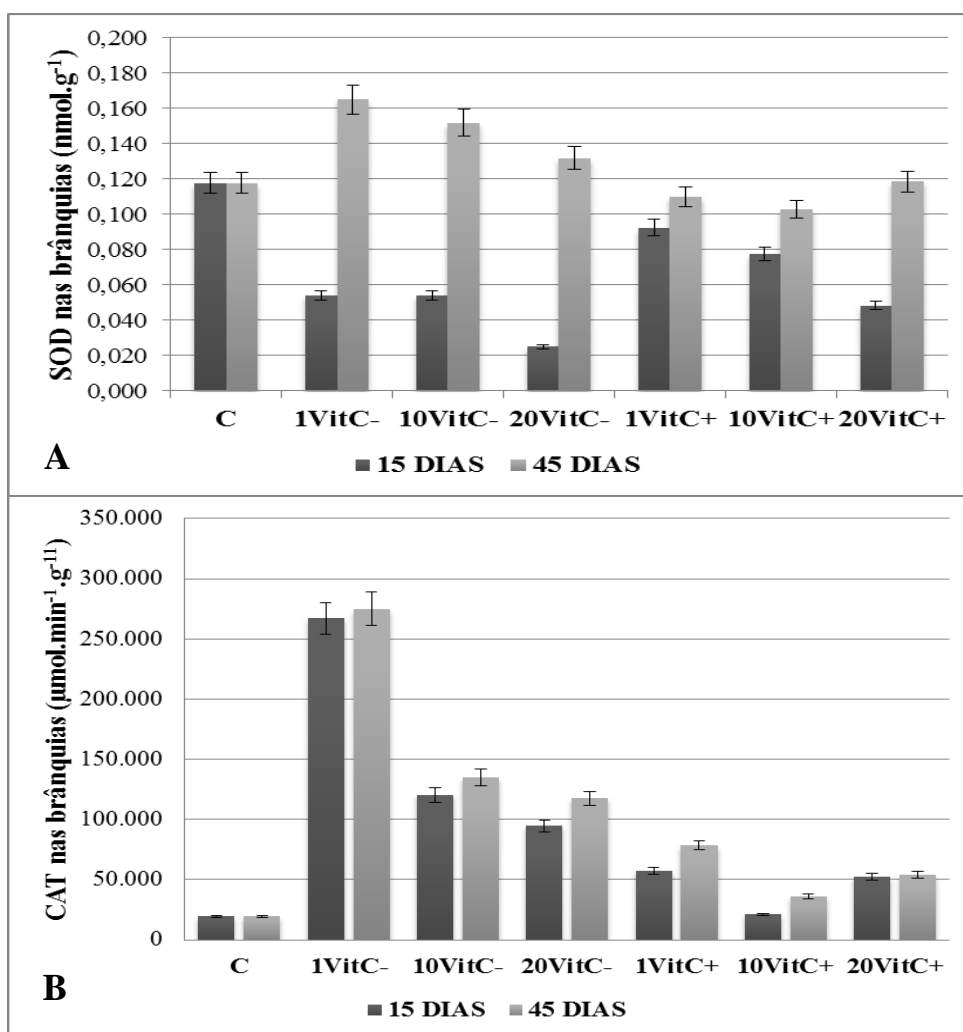


Figura 11: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no tecido branquial de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima SOD no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

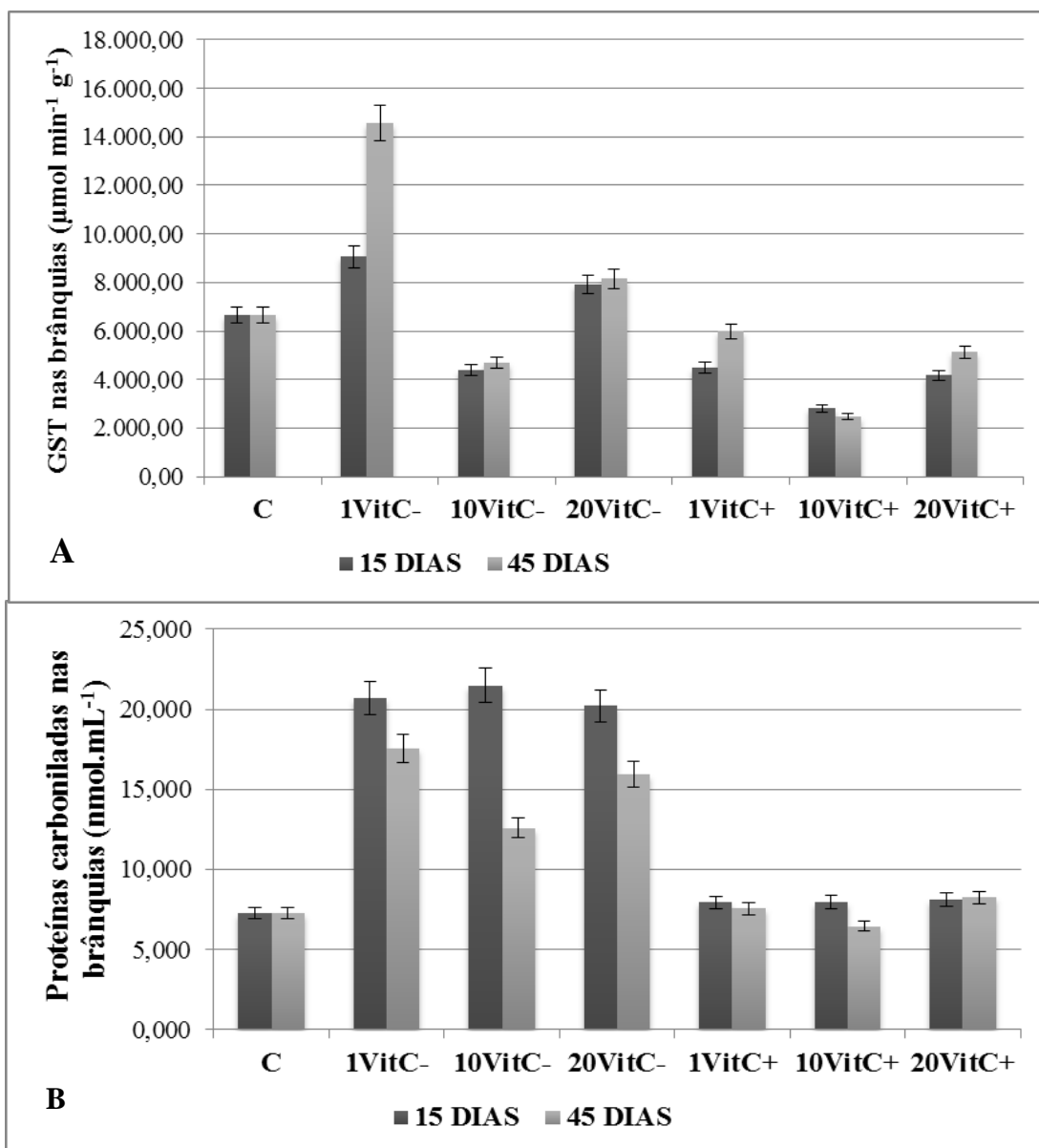


Figura 12: Atividades da enzimas antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido branquial de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido branquial de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

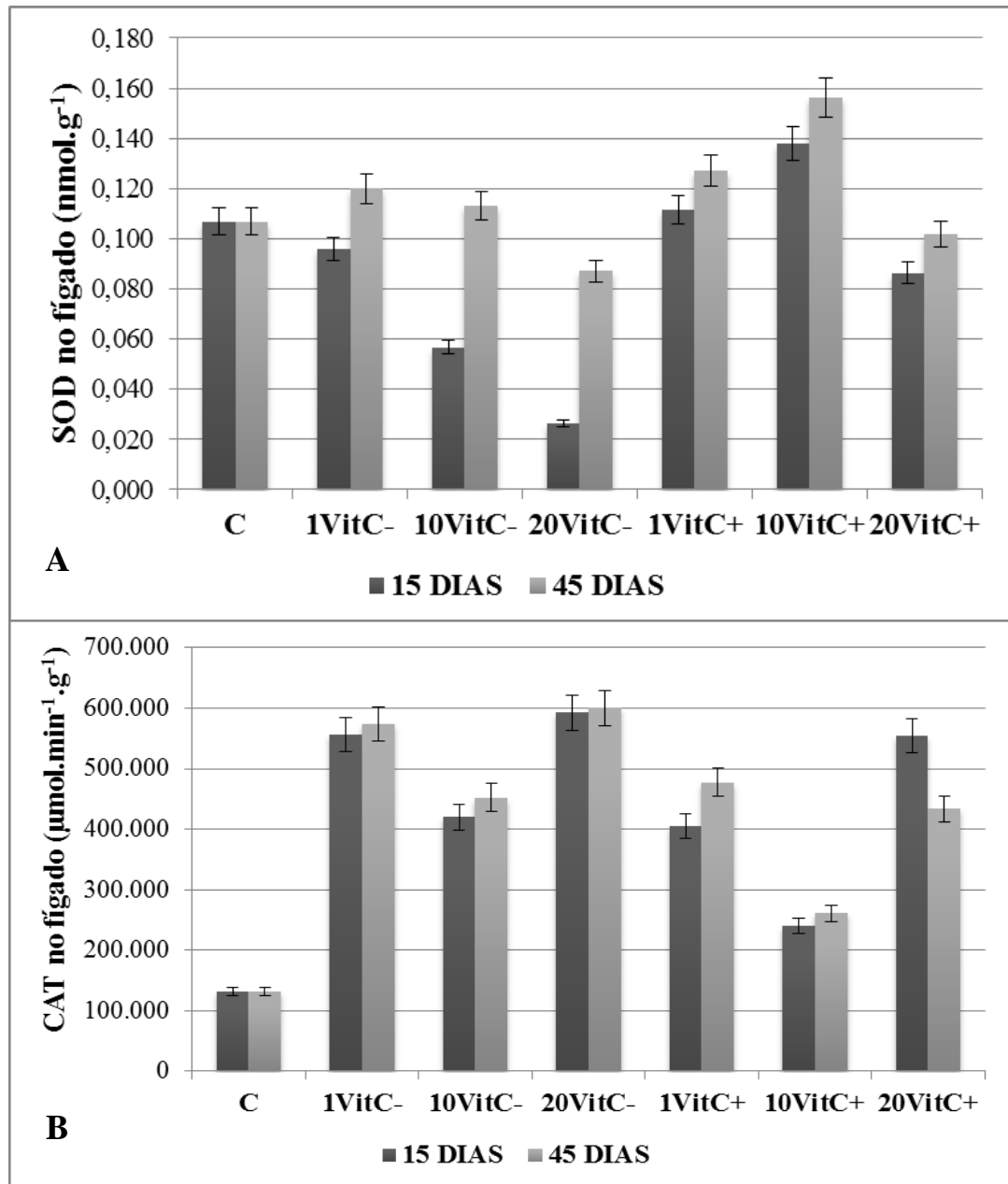


Figura 13: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e proteínas carboniladas no tecido hepático de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima SOD no tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

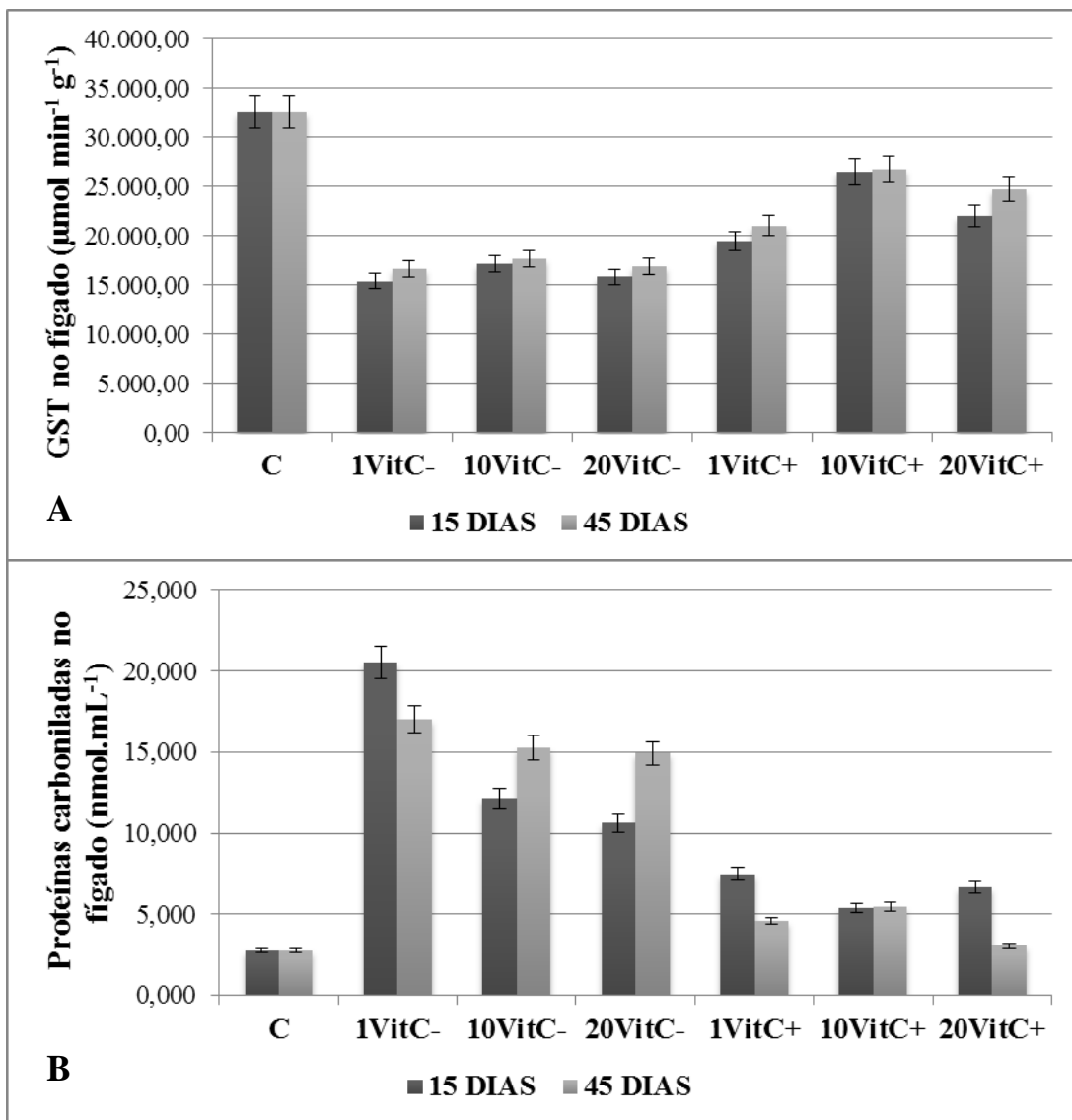


Figura 14: Atividade da enzima antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido hepático de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

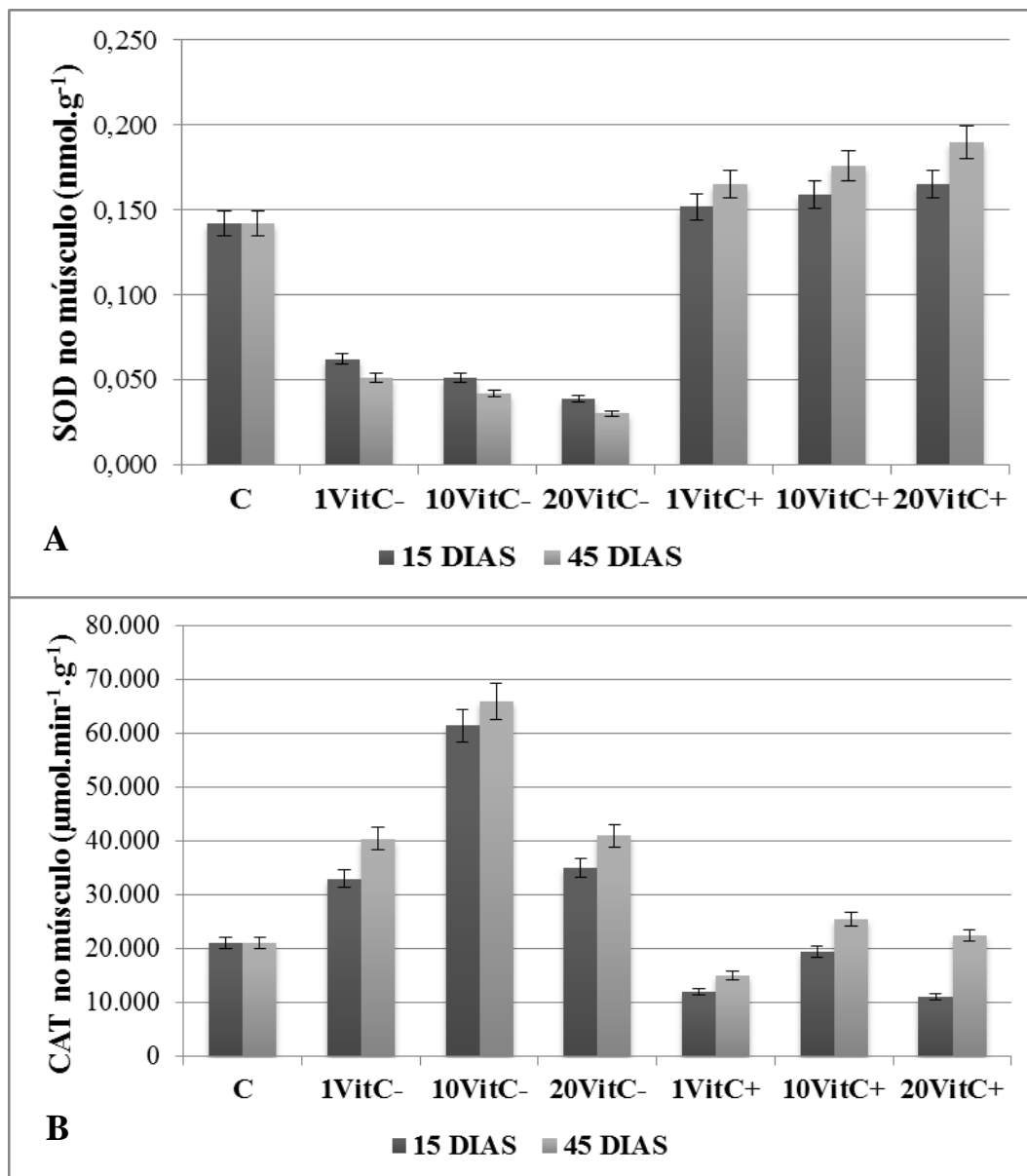


Figura 15: Atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no tecido muscular de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima SOD no tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Atividade da enzima CAT tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

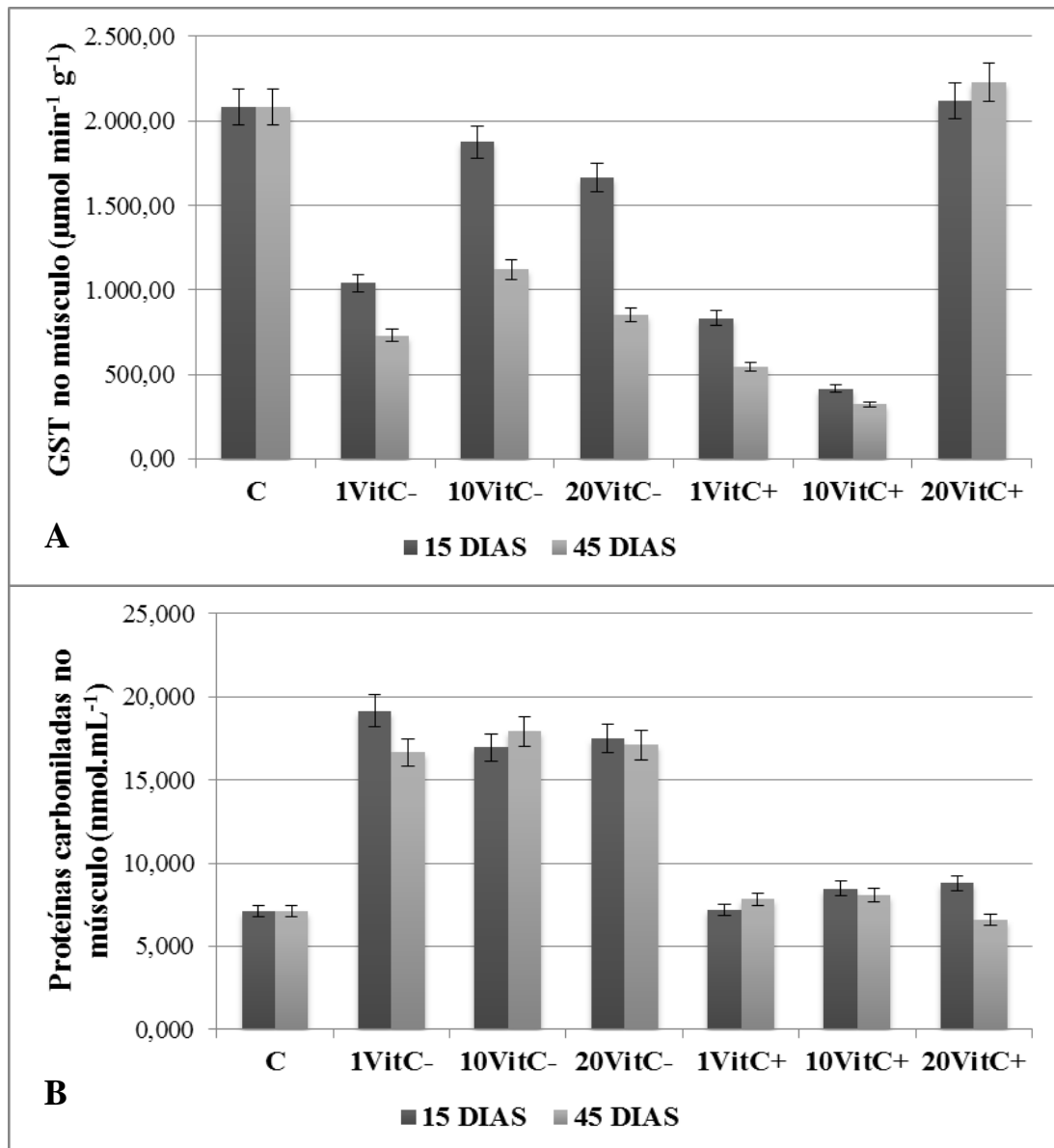


Figura 16: Atividade da enzima antioxidante GST e proteínas carboniladas no tecido muscular de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(A)** Atividade da enzima GST tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias. **(B)** Níveis de proteínas carboniladas no tecido muscular de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Cr (VI) associado ou não a dietas suplementadas com vitamina C durante 15 e 45 dias.

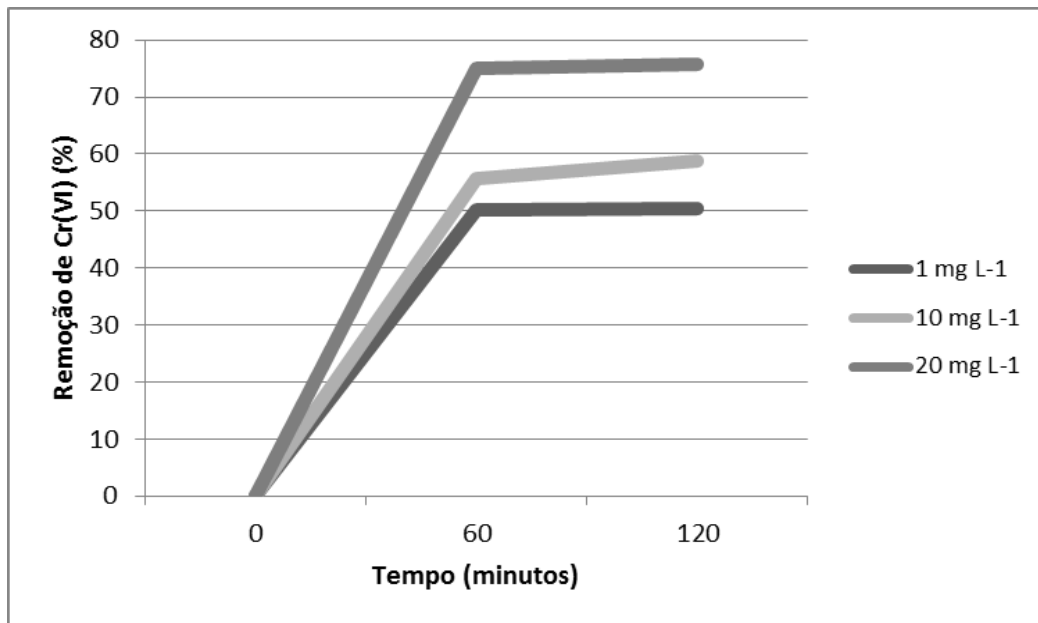


Figura 17: Percentual de remoção de íons de Cr (VI) pelo pó da casca de coco, $C_0 = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; 10 mg.L^{-1} e 20 mg.L^{-1} , $\omega = 175 \text{ rpm}$, $C_{\text{biomassa}} = 5 \text{ g L}^{-1}$.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of health and human services, 2012. pp. 9-47.

[HSDB] Hazardous Substance Data Bank. Copper. In: Tomes CPSTM System. **Toxicology, ocupacional medicine and environmental series**. Englewood: Micromedex, 2000. CD-ROM.

[NRC] National research council. **Nutrient requirements of fishes Washington DC:** National academy of sciences, 1993.

[WHO] WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **Chromium in Drinking-water**. In: Originally published in Guidelines for drinking-water quality, 2 ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1996.

[WHO] World Health Organization. **Chromium**. Environmental Health Criteria, Geneva, 1988.

Abbas, H.H.; Ali, F.K. Study the effect of hexavalent chromium on some biochemical, citotoxicological and histopathological aspects of the *Oreochromis* spp. fish. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 10:3973–3982, 2007.

Abbasi, S.A.; Soni, R. Teratogenic effects of chromium (VI) in environment as evidence by the impact on larvae of amphibian *Rana tigrina*: Implications in the environmental management of chromium. **International Journal of Environmental Studies**, 23:131–137, 1984.

Abdel-Moneim, A.M.; Al-Kahtani, M.A.; Elmenshawy, O.M. Histopathological biomarkers in gill and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, 88:1028-35, 2012.

Abel, P.D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Fish Biology**, 9:441-446, 1976.

Adams, M. (Eds). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, USA, 2002. 600p.

Adams, S.M. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990, pp. 333-353.

Aebi, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, 105: 121-126, 1984.

Agostinho, C.A.; Molinari, S.L.; Agostinho, A.A. Ciclo reprodutivo de machos do lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes-Characidae) no rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Ciência e Cultura**, 34:566, 1982.

Agostinho, C.A.; Molinari, S.L.; Agostinho, A.A. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) (L) (Osteichthyes - Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, 44:31-6, 1984.

Ahmad, S. (ed.) Preface. In: **Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology**. Chapman & Hall, NY, xi-xvii. 1995.

Akaishi, F.M.; Silva de Assis, H.C.; Jakobi, S.C.G.; Eiras-Stofella, D.R.; St-Jean, S.D.; Courtenay, S.C.; Lima, E.F.; Wagener, A.L.R.; Scofield, A.L.; Oliveira Ribeiro, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 46:244-253, 2004.

Al-Asheh, S., Banat, F., AL Omari, R., Duvnjak, Z. Predictions of binary sorption isotherms for the sorption of heavy metals by pine bark using single isotherm data. **Chemosphere**, 41:659–665, 2000.

Aldrich, C., Feng, D. Removal of heavy metals from wastewater effluents by biosorptive flotation. **Minerals Engineering**, 13:1129-1138, 2000.

Almeida-Toledo, L.; Ozouf-costaz, C.; Foresti, F.; Bonillo, C.; Porto-foresti, F.; Daniel-Silva, M.F.Z. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 97:229–233, 2002.

Amorim, P.K.; Ayala, C.O.; Félix, F.C.; Ringolin de Sá, O.; Fenerichverani, N.O. Fígado do bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) como biomarcador da contaminação do agrotóxico omite. In: **Anais do Encontro de Ecotoxicologia**, 2000, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, p.78, 2000.

Aoyama, M., Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solution by cone biomass of *Pinus silvestris*. **Bioresource Technology**, 89:317-318, 2003.

Araújo, F.G.; Simoni, M.R.F. Relação peso comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus parahybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 40:453-458, 1997.

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**, 27:391–395, 2006.

Avci, A.; Kaçmaz, M.; Durak, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:101-105, 2005.

Badre, A.A.; Kumar, K. Malation toxicity: effect on the ovary of zebra fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, 72:517–528, 1987

Barbieri, G.; Hartz, S.M.; Verani, J.R. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 17:1057-65, 1982.

Barbosa, K.B.F; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; de Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição, Campinas**, 23:629-643, 2010.

Barillet, S.; Larno, V.; Floriani, M.; Devaux, A.; Adam-Guillermin, C. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. **Aquatic Toxicology**, 100:295-302, 2010.

Bertolucci, B.; Vicentini, C.A.; Vicentini, I.B.F.; Bombonato, M.T.S. Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 30:73–76, 2008.

Bhattacharya, A.K.; Naiya, T.K.; Mandal, S.N.; Das, S.K. Adsorption, kinetics and equilibrium studies on removal of Cr(VI) from aqueous solutions using different low-cost adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, 137:529-541, 2008.

Bianchi, V.; Zantedeschi, A.; Montaldi, A.; Majona, F. Trivalent chromium is neither cytotoxic nor mutagenic in permeabilized hamster fibroblasts. **Toxicology Letters**, 23:51–59, 1984.

Biomasa. **Manuales sobre energía renovable: Biomasa**. 1 ed. –San José, C.R., 2002, 2 p. Disponível em <http://www.bunca.org/publicaciones/BIOMASA.pdf> acesso em 20/06/2013.

Biomass, site institucional **American Bioenergy Association**. Disponível em http://www.biomass.org/index_files/page0001.htm, acesso em 23/10/2013.

Blazer, V.S. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, 26: 85–101, 2002

Boekelheide, K.; Johnson, K.J.; Richburg, J.H. Sertoli Cell Toxicants. In: Shinner, M.K.; Griswold, M.D. (Eds.). **The Sertoli Cell Biology**. Elsevier Science (USA). 2005. 345-382 pp.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução 357/2005 de 17 de março de 2005**.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução 397/2008 de 3 de abril de 2008**.

Braunbeck, J.B.; Storch, V.; Bresch, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 19:405-418, 1990.

Brown, B.; Ahsanillah. Effect of heavy metals on mortality and growth. **Marine Pollution Bulletin**, 2:182–187, 1971.

Bruslè, J.; Anadon, G.G. The Structure and function of fish liver. In: Munshi, J.S.D.; Dutta, H.M. (Ed.). **Fish morphology horizon of new research**. Lebanon: Science Publishers Inc., 1996, p. 77–93.

Callard, G.V. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (Ed). **The Leydig Cell**. Cache River Press: Vienna, 1996, pp. 308–331.

Camargo, M.M.P.; Martinez, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, 5:327–336, 2007.

Canabarro, L.; Toledo, M.T. Estudo do estresse oxidativo em fígados de peixes *Oreochromis niloticus* capturados em ambientes artificiais na região de Sorocaba SP. **Revista Eletrônica de Biologia**, 1:31-57, 2010.

Carrijo, O.A., Liz, R.S., Makishima, N. Fibra da casca de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura brasileira**, 20:533-535, 2002.

Chandra, K.; Kamala, C.T.; Chary, N.S.; Anjaneyulu, Y. Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control. **International Journal of Mineral Processing**, 68:37-45, 2003

Chen, R.; Lochmann, R.; Goodwin, A. et al. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, 242:553-569, 2004.

Cheung, C.C.C.; Zheng, G.J.; Li, A.M.Y.; Richardson, B.J.; Lam, P.K.S. Relationships between tissue concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, 52:189–203, 2001.

Christiansen, T.; Korsgaard, B.; Jespersen, A. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout (*Zoarces viviparus*). **The Journal of Experimental Biology**, 201:179–192, 1998.

Condessa, S.S. **Toxicidade subcrônica em lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao zinco**. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

Creasy, D.M. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. **Toxicologic Pathology**, 25:119–131, 1997.

Caziñares, R.O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, 42:131-143, 2000.

Danabas, D.; Ural, M. Determination of metal (Cu, Zn, Se, Cr and Cd) levels in tissues of the cyprinid fish, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) from different regions of Keban Dam Lake (Euphrates-Turkey). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 89:455-60, 2012.

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

Diário Oficial do Estado de São Paulo. **Diário da Assembleia Legislativa** – Nº 220 – DOE de 22 de novembro de 2006.

Dieterich, S.; Bieligk, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101: 33-9, 2000.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82: 47-95, 2002.

Dwivedi, S.; Chezian, A.; Kabilan, N.; Kumar, T.S. Synergistic Effect of Mercury and Chromium on the Histology and Physiology of Fish, *Tilapia Mossambica* (Peters, 1852) and *Lates calcarifer Calcarifer* (Bloch, 1790). **Toxicology International**, 19: 235–240, 2012.

El-Gawad, E.A; Hamid, O.M.A. Effect of vitamin C dietary supplementation in reducing the alterations induced by fenitrothion in *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9885-4>.

Erkmen, B.; Kolankaya, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 64:418–425, 2000.

Espósito, A. Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentration. **Hydrometallurgy**, 60:129 - 141, 2001.

Fanta, E.; Rios, F.S.; Romão, S.; Vianna, A.C.C.; Freiburger, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54:119-130, 2003.

Farag, A.M.; May, T.; Marty, G.D.; Easton, M.; Harper, D.D.; Little, E.E.; Cleveland, L. The effect of chronic chromium exposure on the health of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquatic Toxicology**, 76:246–257, 2006.

Farber, J.M.; Levine, R.L. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, 261: 4574-4578, 1986.

Fernandes, M.N.; Mazon, A.F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (Eds.). **Fish adaptations**. Enfield, Science Publishers, 2003, p. 203-231.

Figueiredo-Fernandes, A.; Ferreira-CardosO, J V.; Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Matos, P.; Fontainhas- Fernandes, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27:1-9, 2007.

Flores-lobes, F.I.; Thomaz, A.T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**, 71:1–9, 2011.

Fournier, D.; Bride, J.M.; Poirie, M.; Berge, J.B.; Plapp, F.W. Insect glutathione S-transferase: Biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, 267:1840–1845, 1992.

Fracácio, R.; Verani, N.F.; Espíndola, E.L.G.; Rocha, O.; Rigolin-Sá, O.; Andrade, C.A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46:685- 695, 2003.

Freire, M.M.; Santos, V.G; Ginuino, I.S.F.; Arias, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 12:347-354, 2008.

Fricke, N.F.; Stentiford, G.D.; Feist, S.W.; Langa, T. Liver histopathology in Baltic eelpout (*Zoarces viviparus*) – A baseline study for use in marine environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, 82:1–14, 2012.

Froese, R.; Capuli, E.; Garilao, C.; Pauly, D (Eds.). **FishBase**. World Wide Web electronic publication. 2014.<www.fishbase.org>. Version (06/2012).

Fujioka, K.; Casida, J.E. 2007. Glutathione-S-transferase de conjugação de rendimentos pesticidas organofosforados S-fosfo-, S-arilo e S-alkylglutathione derivados. **Chemical Research in Toxicology**, 20:1211-1217.

Gaballah, I.; Goy, D.; Allain, E.; Kilbertus, G.; Thauront, J. Recovery of copper through decontamination of synthetic solutions using modified barks. **Metallurgical and Materials Transactions B**, 28:13-23, 1997.

Gaballah, I.; Kilbertus, G. Elimination of As, Hg and Zn from synthetic solutions and industrial effluents using modified barks, In: Misra, M. (ed.). **Separation process: Heavy metals, ions and minerals**. The minerals, Metals & Materials Society, 1994.

Gabriel, U.U.; Ezeri, G.N.O.; Amakiri., E.U. Liver and kidney histopathology: Biomarkes of nº 1 fuel toxicosis in african catfish, *Clarias gariepinus*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 6:379–384, 2007.

Garcia-Sanchez, A.; Álvarez-Ayuso, E. Sorption of Zn, Cd, and Cr on calcite. Application to purification of industrial wastewaters. **Minerals Engineering**,15:539 -547, 2002.

Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Fontainhas-Fernandes, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59:376–381, 2007.

Garutti, V. **Piscicultura Ecológica**. São Paulo- SP: Editora UNESP, 2003, 332 p.

Gaspar da Luz, K.D. **Alimentação e sobreposição alimentar de três espécies de peixes, em lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná**. 1996. 62 p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

Gennari Filho, O.; Braga, F.M.S. Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A.schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). **Revista Unimar**, 18:241-254, 1996.

Goldhaber, S.B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 38:232-242, 2003.

Gomes, I.D.; Nascimento, A.A.; Sales, A.; Araújo, F.G. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater neotropical systems?. **Environmental Monitoring Assessment**, 184: 5523–5531, 2012.

Gonzalez, G.; Crespo, S.; Bruske, J. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. **Journal of Fish Biology**, 43:363-373, 1993.

Guilherme, L.R.G.; Marques, J.J.; Pierangeli, M.A.P.; Zuliani, D.Q.; Campos, M.L.; Marchi, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciências do Solo**, 4:345-390, 2005.

Gül, S.; Belge-Kurutas, E.; Yildiz, E.; Sahan, A.; Doran, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, 30:605-609, 2004.

Gundersen, D.T.; Miller, R.; Mischler, A.; Elpers, K.; Mims, S.D.; Millar, J. G. Blazer, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane- contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19:2275-2285, 2000.

Gurgel, H.C.B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21:131-135, 2004.

Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S- Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, 249:7130-7139, 1974.

Halver, J. E. **Fish nutrition. School of aquatic and fishery sciences**. Washington: University of Seattle, 3 th. 2002, p. 99 –107.

Ham, K.D.; Adams, S.M.; Peterson, M.J. Application of multiple bioindicators to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 37: 53–61, 1997.

Hara, T.; Hoshuyama, T.; Takahashi, K.; Delgermaa, V.; Sorahan, T. Cancer risk among Japanese chromium platers, 1976–2003. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, 36:216–221, 2010.

Hasany, S.M.; Ahmad, R. The potential of cost-effective coconut husk for the removal of toxic metal ions for environmental protection. **Journal of Environmental Management**, 81:286–295, 2006.

Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 134:64–71, 2011.

Heath, A.G. **Water pollution and fish physiology**. C.R.C. Press, Boca Raton, FL, 1987, 341 p.

Hermes-Lima, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Kenneth B. Storey (Ed). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley- Liss, NY: John Wiley & Sons, Inc. 2004, 319-368 pp.

Hinton, D.E.; Baumann, P.C.; Gardner, G.R.; Hawkins, W.E.; Hendricks, J.D.; Murchelano, R.A.; Okihiro, M.S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; Kimerli, R.A.; Mehrle, P.M.; Bergman, H.L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, pp. 155-196.

Hinton, D.E.; Laurén, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, 8:51-66, 1990.

Hoar, W.S.; Randall, D.J. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1969, 485p.

Hodson, P.V. The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. **Aquatic Toxicology**, 11:3-18, 1988.

Hollis, L.; McGeer, J. C.; McDonald, D. G.; Wood, C. M. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, 46:101–119, 1999.

Hollis, L.; Playle, R.C. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, 50:703-720, 1997.

Hunt, S. Diversity of biopolymer structure and its potential for ion-binding applications, In: **Immobilization of Ions by biosorption**, Ed. Eccles, H.; Hunt, S. Ellis Horwood Limited publishers, 1986.

Ihering, R.V.; Azevedo, P.A. Curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, 5:143-184, 1934.

Jobling, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman e Hall, 1995, 455 p.

Johnsen, K.; Tana, J.; Lehtinen, K.J.; Stuthridge, T.; Mattsson, J.H.; Carlberg, G. E. Experimental field exposure of brown trout to river water receiving effluent from an integrated newsprint mill. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 40:184-193, 1998.

Karlsson-Norrgren, L.; Runn, P.; Haux, C. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, 27:81-95, 1985.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, 27:137-138, 1965

Karuppasamy, R. Evaluation of Hg concentration in the tissue of fish *Channa punctatus* (Bloch.) in relation to short and long-term exposure to phenyl mercuric acetate. **Journal Plate Jubilee A.U.**, 40:197, 2004.

Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Brandão, K.D.O.; Garcia, C.; Almeida Toledo, L.F. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 134:108-119, 2011.

Kendall, M.W.; Hawkins, W.E. Hepatic morphology and acid phosphatase localization in the channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 32:1459–1464, 1975.

Kelly, P.; Dalla, W.; Spada, S.; Silva, C.O. Antioxidantes não enzimáticos. In: Salvador, M.; Henrique, J.A.P (Eds). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Brasil: Editora Ulbra, 2004, pp. 51- 67.

Kiilunem, M. **Occupational exposure to chromium and nickel in Finland and its estimation by biological monitoring**. 1994. 95 p. Tese (Doutorado). University Publications of Natural and Environmental Sciences, Kuopio, Finlândia, 1994.

Kinnberg, K.; Toft, G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54:16–24, 2003.

Köhler, A.; Deisemann, H.; Lauritzen, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. **Marine Ecology Progress Series**, 91:141-153, 1992.

Kono, Y.; Fridovich, I. Superoxide radicals inhibit catalase. **Journal of Biological Chemistry**, 257:5751-5754, 1982.

Korkmaz, N.; Cengizb, E.I.; Unlub, E.; Uysalc, E.; Yanard, M. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 28:198–205, 2009.

Koulish, S.; Kramer, C.R.; Grier, H.J. Organization of the male gonad in a protogynous Fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, 254:292–311, 2002.

Kubrak, O.I.; Lushchak, O.V.; Lushchak, J.V.; Torous, I.M.; Storey, J.M.; Storey, K.B.; Lushchak, V.I. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 152:360–370, 2010.

Kumar, P.; Kumar, R.; Nagpure, N.S.; Nautiyal, P.; Kushwaha, B.; Dabas, A. Genotoxicity and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in *Cyprinus carpio* after in vivo exposure. **Drug and Chemical Toxicology**, 36:451-60, 2013.

Lars, J. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, 68:167-182, 2003.

Leonardo, J.M.L.O.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P.; Moreira, H.L.M.; Natali, M.R.M.; Volski, T.; Cavichiolo, F. Histologia das Brânquias de larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**. 23:863-870, 2001.

Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 233, 346-357, 1990.

Li, Z.; Li, P.; Randak, T. Evaluating the toxicity of environmental concentrations of waterborne chromium (VI) to a model teleost, *Oncorhynchus mykiss*: a comparative study of in vivo and in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)**, 153:402–407, 2011.

Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A. Genera *Incertae sedis* in characidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Júnior, C.J. (Eds.), **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Edipucrs, 2003, pp. 106–109.

Limón-Pacheco, J.; Gonsebatt, M.E. The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, 674:137-147, 2009.

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**, 93:45–52, 2009.

Lushchak, O.V.; Kubrak, O.I.; Nykorak, M. Z.; Storey, K.B.; Lushchak, V.I. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. **Aquatic Toxicology**, 87:108–114, 2008.

Lushchak, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, 101:13–30, 2011.

Maciel Junior, A. **Efeitos da temperatura no desempenho e na morfometria de tilápia, *Oreochromis niloticus*, de linhagem tailandesa**. 2006. 66p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Maggioni, T.; Hued, A.C.; Monferrán, M.V.; Bonansea, R.I.; Galanti, L.N.; Amé, M.V. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquia River (Córdoba, Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 63:337-353, 2012.

Mallatt, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, 42:630–648, 1985.

Martinez, C.B.R.; Nagaie, M.Y.; Zaia, C.T.B.V.; Zaia, D.A.M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, 64:797-807, 2004.

Martínez-Álvarez, R.M.; Morales, A.E.; Sanz, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 15: 75–88, 2005.

Matis, K.A.; Zouboulis A. I.; Lazaridis N. K.; Hancock I. C. Sorptive flotation for metal ions recovery. **International Journal of Mineral Processing**, 70:99-108, 2003.

Mazon, A.F.; Pinheiro, G.H.D.; Fernandes, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, 62:621-631, 2002.

Mazzoni, R.; Mendonça, R. S.; Caramaschi, E. P. Reproductive biology of *Astyanax janaeirensis* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 65:643–649, 2005.

McDonald, D.G.; Wood, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin JC, Jensen FB. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993, pp. 297–321.

Miles-Richardson, S.R.; Kramer, V.J.; Fitzgerald, S.D.; Render, J.A.; Yamini, B.; Barbee, S.J.; Giesy, J.P. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, 47:129–45, 1999.

Mishra, K.; Mohanty, B.M. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26:136–141, 2008.

Mokhtar, D.M.; Abd-Elhafeez, H.H. Histological changes in selected organs of *Oreochromis niloticus* exposed to doses of lead acetate. **Journal of Life Science and Biomedicine**, 3:256-263, 2013.

Monteiro, D.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 149:40–49, 2009.

Morais, A.L.S.; Mendonça, M.C.F.B.; Gavilan-Leandro, S.A.C.; Souza, I.M.M. Biologia Reprodutiva de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characidae, Characiformes), presente na Lagoa do Piató, em Assú, RN, Brasil. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, 2007, pp.1–2.

Nath, K.; Kumar, N. Gonadal Histopathology Following Nickel Intoxication in the Giant Gourami *Colisa fasciatus* (Bloch and Schneider), a Freshwater Tropical Perch. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 45:299–304, 1990.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 3ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152 p.

Nero, V.; Farwell, A.; Lister, A.; Van Der Kraak, G.; Lee, L.E.J.; Van Meer, T.; MacKinnon, M.D.; Dixon, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safet**, 63:365–377, 2006.

Nomura, H. Alimentação de três espécies de peixes do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae) do Rio Mogi-Guaçu, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, 35:595-614, 1975.

Oliver, C.N. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 253: 62-72, 1987.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Vollaire, Y.; Sanchez-Chardi, A.; Roche, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, 74:53-69, 2005.

Olojo, E.A. A.; Olurin, K. B.; Mbaka, G.; Oluwemimo, A. D. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. **African Journal of Biotechnology**, 4:117-122, 2005.

Pacheco, M.; Santos, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 53:331-347, 2002.

Pagnanelli, F.; Trifoni, M.; Beolchini, F.; Esposito, A.; Toro, L.; Veglio, F. Equilibrium biosorption studies in single and multi-metal systems. **Process Biochemistry**, 37:115-124, 2001.

Paiva, S.R.; Dergam, J.A.; Machado, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, 560:393–404, 2006.

Palaniappan, R.M.; Karthikeyan, S. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. **Journal of Environmental Sciences**, 21:229–236, 2009.

Palmer, C.D.; Puls, R.W. Natural attenuation of hexavalent chromium in groundwater and soils. **EPA Ground Water Issue**, 5:1–12, 1994.

Pandey, S.; Ahmad, I.; Parvez, S.; Bin-Hafeez, B.; Haque, R.; Raisuddin, S. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 41:345–352, 2001.

Pandey,S.; Parvez,S.; Sayeed,I.; Haque,R.; Bin-Hafeez,B.; Raisuddin,S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallagoattu (Bl. &Schn.). **Science of Total Environmental**, 309:105–115, 2003.

Paris-Palácios, S.; Biagianti-Risbourg, S.; Vernet, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, 50:109-124, 2000.

Parvathi, K.; Sivakumar, P.; Sarasu, C. Effects of Chromium on histological alterations of gill, liver and kidney of fresh water teleost, *Cyprinus carpio* (L.). **Journal of Fisheries International**, 6:1-5, 2011.

Parveza, S.; Raisuddin, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20: 112–117, 2005.

Patil, V.K.; David, M. Oxidative stress in freshwater fish, *Labeo rohita* as a biomarker of malation exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, 185:10191-9, 2013.

Pawert, M.; Müller, E.; Triebkorn, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. **Tissue & Cell**, 30: 617-626, 1998.

Pawlisz, A.V.; Kent, R.A.; Schneider, U.A.; Jefferson, C. **Canadian Water Quality Guidelines for Chromium**. Evaluation and interpretation branch, ecosystem conservation directorate, environment Canada, Ottawa. Ontario, 1997, pp. 124–125.

Perry, S.F.; Laurent, P. Adaptational Responses of Rainbow Trout to Lowered External NaCl Concentration: Contribution of the Branchial Chloride Cell. **Journal Experimental Biology**, 147-168, 1989.

Pieterse, G.M. **Histopathological changes in testis of *Oreochromis mossambicus* (cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution**. 2004. 183 p. Tese (Doutorado). Faculty of Science at the Rand Afrikaans University, 2004.

Pieterse, G.M.; van Vuren, J.H.J. **The effect of copper on sperm development in the Teleost *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae)**. Proceedings of the 9th International Symposium on Spermatology, Cape Town, 2002, pp.51-54.

Pincemail, J.; Bonjean, K., Cayeux, K.; Defraigne, J.O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. **Nutrition Clinique et Métabolisme**, 16: 233-239, 2002.

Pinto, G.S.; Leite, S.G.F.; Cunha, C.D.; Mesquita, L.M.S. Aplicação de microrganismo no tratamento de resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos. **Methodus – revista científica e cultural**. Universidade Estácio de Sá, ano 3, n.5, 2001.

Pino, G. H.; de Mesquita, L.M.S.; Torem, M.L. Biosorption of heavy metals by powder of green coconut shell separation. **Science and Technology**, 41: 3141–3153, 2006.

Polëksic, V.; Mitrovic-Tutundžic, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994, pp. 339–352.

Pudney, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, 6:459–497, 1995.

Rabitto, I.S.; Costa, J.R.M.A.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Akaishi, F.M.; Anjos, A.; Randi, M.A.F.; Oliveira Ribeiro, C.A. Effects of dietary Pb (II) and TBT (tributyltin) on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:147–156, 2005.

Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, 1985, pp. 1-28.

Regoli, F.; Winston, G.W.; Gorbi, S.; Frenzilli, G.; Nigro, M.; Corsi, I.; Focardi, S. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22:2120–2129, 2003.

Reis, A.B.; Sant'Ana, D.M.G.; Azevedo, J.F.; Merlini, L.S.; Araújo, E.J.A. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29:303-311, 2009.

Riley, J.C.M.; Behrman, H.R. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 198:781-791, 1991.

Roberts, R.J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: Tindal, L.B. (Ed.). **Fish Pathology**, 1989, pp. 56–134.

Romanenko, V.D.; Malyzheva, T.D.; YU, Y.N. The role of various organs in regulating zinc metabolism in fish. **Hydrobiology**, 21:7-12, 1986.

Rosety-Rodríguez, M.; Ordoñez, F.J.; Rosety, J.M.; Rosety, I.; Ribelles, A.; Carrasco, C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 51:223-228, 2002.

Rotta, M.A. **Utilização do ácido ascórbico (vitamin C) pelos peixes**. Empresa de pesquisa brasileira agropecuária – EMBRAPA. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003, 54p.

Saleh, H. H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. **Bulletin of the Institute of Oceanography and Fisheries**, 8:69-79, 1982.

Santos, D.C.M.; Matta, S.L.P.; Oliveira, J.A.; Santos, J.A.D. Histological alterations in gills of *Astyanax* aff. *bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Experimental Toxicology and Pathology**, 64:861–866, 2012.

Santos, R.A.; Campos, E.C.; Camara, C.; Mandelli Junior, J. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 18:1-11, 1991.

Sato, Y.; Sampaio, E.V.; Fenerich-Verani, N.; Verani, J.R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 267–273, 2006.

Schacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, 32:307-326, 2000.

Schulz, R.W.; Menting, S.; Bogerd, J.; Franca, L.R.; Vilela, D.A.R., Godinho, H.P. Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology Reproduction**, 73:891–898, 2005.

Schulz, R.W.; Miura, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**. 26:43–56, 2002.

Schwaiger, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 8:231-240, 2001.

Schwaiger, J.; Wanke, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Triebkorn, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6:75-86, 1997.

Sedman, R.M.; Beaumont, J.; McDonald, T.A.; Stephen, R.; Krowech, G.; Howd, R. Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent chromium in drinking water. **Journal of Environmental Science and Health Part C**, 24:155–182, 2006.

Sehgal, R.; Saxena, A.B. Toxicity of Zinc to a Viviparous Fish, *Lebistes reticulatus* (Peters). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 36:888-894, 1986.

Sharma, R. K.; Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, 48:835-850, 1996.

Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M.; Dowd, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, 360:1-16, 2001.

Shobikhuliatul, J. J; Andayani, Sri.; Couteau, J.; Risjani, Y.; Minier, C. Some Aspect of Reproductive Biology on the Effect of Pollution on the Histopathology of Gonads in *Puntius Javanicus* from Mas River, Surabaya, Indonesia. **Journal of Biology and Life Science**, 4:191-205, 2013.

Silva, C.S.; Pedrozo, M.F.M. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. **Série de cadernos de referência ambiental**. V.05. Salvador, 2001, pp. 55.

Silva, H.B.R. **Alimentação de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) na área da influência do reservatório de Corumbá, GO**. 1998. 60p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

Silva, J.V.; Andrade, D.R.; Okano, W.Y. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris - tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 48:47-54, 1996.

Silva, L.S.; Vicenzi, R.; Peixoto, C.R.M. Efeito do íon malato no processo de oxidação do ácido ascórbico por oxigênio molecular catalisado por íons cobre II. **Eclética química**, 32:35-40, 2007.

Squadrone, S.; Prearo, M.; Brizio, P.; Gavinelli, S.; Pellegrino, M.; Scanzio, T.; Guarise, S.; Benedetto, A.; Abete, M.C. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere**, 90:358-65, 2013.

Stara, A.; Machova, J.; Velisek, J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 33:334–343, 2012.

Stentiford, G.D.; Longshaw, M.; Lyons, B.P.; Jones, G.; Green, M.; FEIST, S.W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, 55:137–159, 2003.

Tacon, A.G.J. **Nutritional fish pathology: morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish**. Rome: FAO, p. 75, 1992.

Takashima, F.; Hibiya, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2ed. Tokyo: Kodansha, 1995, 213 p.

Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, 37:51–70, 1997.

Temmink, J.; Bouwmeister, P.; de Jong, P. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, 4:165-179, 1983

Thomas, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. **American Fisheries Society Symposium**, 8:9-28, 1990.

Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 121:307–320, 2003.

van den Belt, K.P.; Wester, W.; van der Ven, L.T.M.; Verheyen, R.; Witters, H. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21:767–75, 2002.

van der Ven, L.T.M., Wester, P.W.; Vos, J.G. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22:908–13, 2003.

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

Velma, V.; Tchounwou, P.B. Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. **Mutation Research**, 698:43–51, 2010.

Velma, V.; Vutukuru, S.S.; Tchounwou, P.B. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. **Reviews on Environmental Health**, 24:129–145, 2009.

Veloso-Júnior, V.C.; Guimarães-Cruz, R.J.; Barros, M.D.M.; Barata, R.S.L.; Santos, J.E. Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, 25: 314–320, 2007.

Vergilio, C.S.; Moreira, R.V.; Carvalho, C.E.V.; Melo, E.J.T. Histopathological effects of mercury on male gonad and sperm of tropical fish *Gymnotus carapo in vitro*. **E3S Web of Conferences**, 1:1-4, 2013.

Vicentini, C.A.; Franceschini-Vicentini, I.B.; Bombonato, M.T.S.; Bertolucci, B.; Lima, S.G.; Santos, A.S. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal Morphology**, 23:211–216, 2005.

Vincent, J.B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium binding substance. **Journal of the American College of Nutrition**, 18:6–12, 1999.

Volesky, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, 59:203-216, 2001.

Volesky, B. **Sorption and biosorption**, BV-Sorbex, Inc., St.Lambert, Quebec, 326 p, 2004.

Wang, X.S.; Qin, Y. Equilibrium sorption isotherms for Cu (II) on rice bran. **Process Biochemistry**, 40:677-680, 2005.

Wester, P.W.; van der Ven, L.T.M.; VethaaK, A.D.; Grinwis, G.C.M.; VOS, J.G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11:289-295, 2002.

White, A.; Fletcher, T. C.; Secombes, C. J.; Houlihan, D. F. The effect of different dietary levels of vitamins C and E on their tissue levels in the Atlantic salmon *Salmo salar* L. In: Kaushik, S.J.; Luquet, P. (Eds). International symposium of fish nutrition and feeding. **Fish nutrition in practice: proceedings**. Paris: INRA, 1993, p.203-207.

Wong, S.Z.H.; Ching, B.; Chng, Y.R.; Wong, W.P.; Chew, S.F.; Ip, Y.K. Ascorbic acid biosynthesis and brackish water acclimation in the Euryhaline Freshwater White-Rimmed Stingray, *Himantura signifier*. **Public Library of Science**, 8: e66691, 2013.

Yamamoto, Y.; Inoue, M. Effects of dietary ascorbic acid and dehydroascorbic acid on the acute cadmium toxicity in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, 51:1299-1303, 1985.

Yonar, S.M. Toxic effects of malation in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 97:223–229, 2013.

Zagal, A.; Mazmanci, B.I. Oxidative stress response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile mill effluent. **Toxicology and Industrial Health**, 27:81–85, 2011.

Zhang, X.; Yang, F.; Zhang, X.; Xu, Y.; Liao, T.; Song, S.; Wang, H. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). **Aquatic Toxicology Journal**, 86:4–11, 2008.