

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA

MARCELA BRÜGGEMANN DE SOUZA TEIXEIRA

INTOXICAÇÃO POR CHUMBO E COBRE EM CARPA-CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

LAGES

2024

MARCELA BRÜGGEMANN DE SOUZA TEIXEIRA

**INTOXICAÇÃO POR CHUMBO E COBRE EM CARPA-CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciência Animal, da
Universidade do Estado de Santa Catarina,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal, área
de concentração em Saúde Animal.
Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes Moraes.

LAGES

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Teixeira, Marcela Brüggemann de Souza
INTOXICAÇÃO POR CHUMBO E COBRE EM
CARPA-CAPIM (Ctenopharyngodon idella):
CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
ANATOMOPATOLÓGICOS / Marcela Brüggemann de Souza
Teixeira. -- 2024.
48 p.

Orientador: Aury Nunes de Moraes
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2024.

1. metabolismo oxidativo. 2. fragilidade osmótica
eritrocitária. 3. ictiopatologia. I. de Moraes, Aury Nunes. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.


MARCELA BRÜGGEMANN DE SOUZA TEIXEIRA

**INTOXICAÇÃO POR CHUMBO E COBRE EM CARPA-CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS**

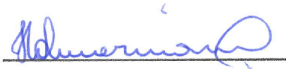
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciência Animal, da
Universidade do Estado de Santa Catarina,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal, área
de concentração em Saúde Animal.

BANCA EXAMINADORA


Membros:



Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
UDESC/Lages-SC
Orientador



Profa. Dra. Francielli Cordeiro Zimmerman
UFSC /Curitibanos



Profa. Dra. Julieta Volpato
UDESC/Lages-SC

Lages, 26 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por todas as oportunidades e aprendizados ao longo do mestrado, e principalmente, ao Seu amor incondicional e força renovados em minha vida a cada manhã. Seu cuidado sempre esteve presente e me deu forças para continuar, mesmo quando os dias se fizeram cinzas, Sua mão estava sobre a minha vida e me conduziu de volta ao caminho.

Sou grata aos meus pais, Giselle e Marcelo, que sempre estiveram comigo, me apoiando em cada desafio e incentivando a alcançar meus objetivos. E também ao meu irmãozinho, Theodoro, por ser minha principal motivação para continuar. Obrigada por que desde cedo me ensinaram a procurar viver da forma mais honesta e justa, e ainda, que nossos princípios são inegociáveis. Essa é a minha maior herança.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes, que se tornou um referencial de médico veterinário, professor, e principalmente, orientador para mim. Obrigada por ter aceitado me orientar, mesmo com tantos desafios, sobretudo cronológicos. Obrigada por confiar no meu trabalho, por incentivar o meu crescimento, se alegrar com minhas conquistas, por me aconselhar e me guiar nessa jornada, renovando o ânimo quando necessário e sempre dando suporte em cada etapa da realização dessa pesquisa com muito entusiasmo.

Agradeço muitíssimo a Prof^a Dra. Indianara Barcarolli, que me instruiu e esteve presente em tantos momentos importantes ao longo deste trabalho. Obrigada por ter sido além de um referencial acadêmico, um exemplo de mulher forte, gentil e acolhedora. Foi uma alegria imensa poder trabalhar com a senhora, guardarei na memória com muito carinho todos os dias de análises e toda a rotina no Laboratório de Toxicologia Ambiental, pois foi um período maravilhoso.

Agradeço também a Prof^a Dra. Mere Saito e a todos os membros do Laboratório de Análises Clínicas que fizeram parte desse trabalho (Prof^a Dra. Letícia Yonezawa e aos pós graduandos Thais dos Santos, Jucemara de Medeiros e Leonardo Deschamps), que por mais laboriosos que pudessem ser os dias de análise, estar com vocês fez tudo isso ocorrer com muita leveza e bom humor. Obrigada professora Mere por permitir que eu me apaixonasse novamente pela patologia clínica, área que tem um lugar especial no meu coração.

Agradeço a Profª Sandra Traverso e a todos do Laboratório de Produção e Sanidade Animal, por todo suporte nas avaliações anatomopatológicas e obrigada por que juntos pudemos nos encantar pelo mundo roxo e rosa da ictiopatologia.

Sou especialmente grata a todos os voluntários do curso de Medicina Veterinária que me ajudaram ao longo do experimento, em especial: Maiara, Raul, Leonora, Alinne, Brenda e Eduarda. Obrigada por me ajudarem tanto na realização dos manejos, por serem tão esforçados e interessados, e principalmente, por todo zelo e respeito que tiveram por cada animal. Isso tudo reflete a seriedade e dedicação de vocês, tenho certeza que serão ótimos médicos veterinários.

Agradeço aos meus colegas de pós graduação e amigos, que estiveram comigo em tantos momentos ao longo desses dois anos. Em especial, Fernanda, Leandro, Alessandra, Anna Caroline, Roberta e Anthony, vocês foram o alívio e alegria quando eu mais precisei. Sentirei saudades de todos os momentos que pudemos passar juntos, desde as inúmeras horas no laboratório, nossos cafés e lanches, madrugadas a dentro regadas de muito estudo e também de boas risadas, e em especial de toda parceria e união em todos os momentos.

Sou extremamente grata ao Setor de Atendimento e Reabilitação de Animais Selvagens (SARAS-UDESC) por terem me recebido tão bem na rotina hospitalar. Em especial, a mestrande Vanessa Arnauld e aos bolsistas Leonora, Maiara, Lara(s), Bárbara, Luisa, Julia, Larissa e Gustavo. E obviamente ao professor Aury, mais uma vez, por todos os ensinamentos e por dedicar tanto carinho aos animais e ao setor nos últimos anos. Obrigada por acolherem uma entusiasta da patologia animal na clínica de selvagens, sem dúvidas vocês todos contribuíram para que a minha paixão pelos animais selvagens se tornasse ainda maior.

Agradeço ainda, aqueles que indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho, Marlise, Ana Alice, Paulo, Joanny e Edson. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim, vocês foram luz e renovo na minha vida.

Agradeço ainda, ao Laboratório de Piscicultura (LAPIS), bem como, ao Profº Thiago Fabregat e aos pós graduandos, Mariana, Luiz, Gustavo e Fernanda que nos auxiliaram quanto as adaptações e acomodação dos peixes para que as melhores condições de bem estar fossem estabelecidas.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade da realização do mestrado e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por permitirem a realização dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte de tudo isso, humanos e animais, serei eternamente grata.

אַבְנֵן הָעֶזֶר

Ebenézer! Até aqui nos ajudou o Senhor.

1 Sm 7:12

RESUMO

A contaminação ambiental por metais pesados, especialmente a intoxicação em peixes, é uma preocupação crescente devido aos impactos prejudiciais nos ecossistemas aquáticos. Os peixes, sendo indicadores sensíveis das condições ambientais, desempenham um papel vital na cadeia alimentar aquática. A bioacumulação desses metais em peixes não apenas representa uma ameaça para a saúde humana, mas também um risco para a preservação de espécies. O objetivo deste estudo foi analisar os possíveis efeitos tóxicos do cobre e chumbo, individualmente, em peixes, e caracterizar as alterações hematológicas, bioquímicas e anatomopatológicas decorrentes dessa exposição. Para tal, 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) foram aclimatadas e posteriormente realizado o teste de intoxicação aguda (96h) com cobre e chumbo nas concentrações de 2, 3 e 4 mg/L cada. Ao fim do período de intoxicação, amostras sanguíneas foram colhidas e procedeu-se com a avaliação hematológica e de estresse oxidativo. Os peixes foram eutanasiados e necropsiados, com a colheita associada de material para avaliação histopatológica e enzimática (cérebro, brânquias e fígado) para atividade da acetilcolinesterase, catalase, glutathione-S-transferase e análise de proteína totais. Os resultados de cada atividade enzimática foram expressos em média e desvio padrão. Esses resultados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk e submetidos à análise de variância (ANOVA), e ao teste de comparação das médias encontradas, mediante a utilização do teste de Tukey, que analisou a diferença mínima significativa entre as médias, considerando o nível de significância de 5%. Para as variáveis qualitativas, a estatística descritiva foi utilizada para compilação e classificação dos dados. Observou-se então, para os animais intoxicados por cobre diferença estatística significativa para a concentração de Glutathione S-transferase branquial nos grupos 2 e 3mg/L. Dos parâmetros hematológicos, houve diminuição do número de eritrócitos no grupo Pb 2mg/L. As principais alterações anatomopatológicas foram observadas em brânquias (branquite mista associada a proliferação do epitélio filamentar, descamação epitelial e edema intraepitelial), fígado (degeneração hepatocelular) e rins (hemorragia subcapsular e intersticial).

Palavras-chave: metabolismo oxidativo; fragilidade osmótica eritrocitária; ictiopatologia.

ABSTRACT

Environmental contamination by heavy metals, especially fish poisoning, is a growing concern due to harmful impacts on aquatic ecosystems. Fish, being sensitive indicators of environmental conditions, play a vital role in the aquatic food chain. The bioaccumulation of these metals in fish not only represents a threat to human health but also a risk to species preservation. The objective of this study was to analyze the possible toxic effects of copper and lead, individually, on fish, and to characterize the hematological, biochemical, and anatomopathological changes resulting from this exposure. To this end, 56 grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) were acclimatized and subsequently carried out the acute poisoning test (96h) with copper and lead at concentrations of 2, 3, and 4 mg/L each. At the end of the intoxication period, blood samples were collected for hematological and oxidative stress evaluation. The fish were euthanized and necropsied, with the associated collection of material for histopathological and enzymatic evaluation (brain, gills, and liver) for acetylcholinesterase activity, catalase, glutathione-S-transferase, and total protein analysis. The results of each enzymatic activity were expressed as mean and standard deviation. These results were evaluated using the Shapiro-Wilk test and submitted to analysis of variance (ANOVA), and the comparison test of the means found, using the Tukey test, which analyzed the minimum significant difference between the means, considering the level significance level of 5%. For qualitative variables, descriptive statistics were used to compile and classify data. For animals poisoned by copper, a statistically significant difference was observed for gill GST concentration in groups 2 and 3mg/L. Of the hematological parameters, there was a decrease in the number of erythrocytes in the Pb 2mg/L group. The main anatomopathological changes were observed in gills (mixed branchitis associated with proliferation of the filamentary epithelium, epithelial desquamation, and intraepithelial edema), liver (hepatocellular degeneration), and kidneys (subcapsular and interstitial hemorrhage).

Keywords: oxidative metabolism; erythrocyte osmotic fragility; ichthyopathology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de eutanásia em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). A) Anestesia com cetamina e xilazina, intramuscular. B) Aplicação de lidocaína via intratecal. C) Monitoração dos batimentos cardíacos com doppler ultrassônico, para confirmação do óbito. D e E) Radiografia do local da punção intratecal para comprovação do acesso.....25

Figura 2. Metodologia utilizada para a necropsia de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). A) Medição do comprimento entre boca e cauda. B e C) Abertura da cavidade através de incisão ventral mediana e monobloco de órgãos para avaliação macroscópica. D) Compilado das amostras colhidas para histologia e toxicologia...27

Figura 3. Avaliação do estresse oxidativo da (A) Glutathiona reduzida eritrocitária (GSH) e (B) Malondialdeído eritrocitário (MDA) de 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).29

Figura 4. Valores médios de hemólise em diferentes concentrações de NaCl em 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).....32

Figura 5. Avaliação toxicológica da atividade de (A) glutathiona-S-transferase (GST), (B) catalase (CAT) em fígado, rins e brânquias e (C) acetilcolinesterase em encéfalo em 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8). *p<0,05 entre as concentrações sinalizadas.34

Figura 6. A) Carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Fígado amarelado, difuso e acentuado devido a esteatose (*); vesícula biliar (ponta de seta). B) Carpa-capim,. Rins com áreas vermelho-escuras multifocais moderadas, hemorragia (ponta de seta); bexiga natatória (*).35

Figura 7. Fotomicrografia das lesões em brânquias encontradas em carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre e chumbo. A) Proliferação parcial do epitélio filamentar (ponta de seta) e edema intraepitelial (seta). (Cu1) HE, 20x. B) Proliferação do epitélio filamentar quase total (ponta de seta). (Cu3) HE, 20x. C) Proliferação do epitélio filamentar em padrão quase total (seta) e total, com fusão das lamelas secundárias (ponta de seta), além de edema (*). (Cu3), HE, 20x. D) Infiltrado de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, na luz entre lamelas primárias, associado a descamação epitelial (*). (Cu1), HE, 20x.39

Figura 8. Fotomicrografia das principais lesões histopatológicas em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre e chumbo. A) Hepatopâncreas: degeneração hepatocelular difusa acentuada (Pb1, HE, 40x). B) Rim: hemorragia subcapsular focalmente extensa moderada (*) (Pb2, HE, 10x). C)

Baço: aumento no número de melanomacrófagos difuso moderado (Pb3, HE, 20x) D)
Fígado: marcação positiva para cobre discreta (+) no interior de hepatócitos (setas).
(Cu3, Rodanina, 20x).42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de toxicidade aguda para cobre (Cu) e chumbo (Pb) em <i>Ctenopharyngodon idella</i> , concentração dos metais para cada grupo.....	23
Tabela 2. . Média e desvio padrão dos parâmetros de eritrograma, leucograma, contagem trombocitária e mensuração da proteína plasmática total de 56 carpas-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8). *p<0,05 entre as concentrações sinalizadas	31
Tabela 3.Valores médios e desvio padrão das concentrações de NaCl com 50% de hemólise em 56 carpas-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).....	32
Tabela 4. Alterações histopatológicas de brânquias de 56 carpas-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).....	36
Tabela 5. Alterações histopatológicas de 56 carpas-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 HIPÓTESES.....	15
1.2 OBJETIVOS GERAIS	15
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Intoxicação por metais em peixes	17
2.2 Cobre.....	18
2.3 Chumbo.....	19
ARTIGO - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, HEMATOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR COBRE E CHUMBO EM CARPA-CAPIM (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 TESTE DE INTOXICAÇÃO	23
2.2 HEMATOLOGIA	23
2.3 EUTANÁSIA	25
2.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA	25
2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS BIOMARCADORES.....	26
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4. CONCLUSÃO.....	43
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	44

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade é caracterizada pela diversidade biológica em todos os níveis, desde microrganismos a seres complexos como plantas e animais (ALHO, 2012), sendo um bem comum essencial para a humanidade, a biodiversidade passa por uma das piores crises mundiais em decorrência da preocupante diminuição do número de espécies e habitats nos últimos anos (PERES; VERCILLO; DIAS, 2011). Das 1249 espécies ameaçadas de extinção no Brasil, os peixes representam o maior número de espécies, sendo 291 de peixes continentais e 97 peixes marinhos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2022).

A água é um recurso essencial para a vida e para o equilíbrio dos ecossistemas, no entanto, a ação antrópica tem causado a um desequilíbrio no meio ambiente através da poluição das águas em diversas partes do mundo. A poluição resulta da introdução de substâncias tóxicas, resíduos industriais, esgotos, agrotóxicos, óleos e outros poluentes em rios, lagos, oceanos e aquíferos. Esses poluentes têm efeitos devastadores sobre a vida aquática, a saúde humana e o meio ambiente em geral (REGINA et al., 2002; SOUZA; MORASSUTI; DEUS, 2018).

As atividades humanas são responsáveis por introduzir anualmente uma grande quantidade de metais nos ecossistemas terrestres e aquáticos em todo o mundo, chegando a cerca de 1,16 milhões de toneladas (NRIAGU; PACYNA, 1988). No Brasil, a mineração de metais como níquel, ouro, ferro e outros de interesse comercial desempenha um papel significativo na liberação de resíduos que resultam na contaminação do solo e da água por metais. O aumento nas concentrações desses resíduos no solo e nos efluentes próximos às áreas de mineração pode estar relacionado a processos químicos e biológicos que influenciam a solubilidade, a disponibilidade para os organismos vivos e a mobilidade desses metais. Essa contaminação representa um desafio significativo para a saúde ambiental e a qualidade da água, exigindo a implementação de medidas adequadas de prevenção e controle da poluição por metais (MARQUES et al., 2005).

A contaminação das águas por metais tem papel importante ao gerar impactos ambientais, sendo causada principalmente por atividades industriais, mineração e o

descarte inadequado dessas substâncias. Os peixes são animais sensíveis a esses compostos e quando expostos a altas concentrações de metais pesados acabam acumulando-os nos tecidos, muitas vezes atingindo níveis tóxicos e consequente manifestação clínica (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

A contaminação da água por metais pesados possui uma série de consequências, seja diretamente causando injúrias aos sistemas orgânicos dos peixes, principalmente fígado, rins e sistema nervoso (JEZIERSKA; WITESKA, 2006); através de disfunções reprodutivas dificultando a reprodução dessas espécies, com a diminuição na produção de gametas e na taxa de fertilidade; por meio da bioacumulação e biomagnificação, pois os metais tem capacidade de se acumular no tecido dos peixes ao longo do tempo, uma vez que, esse grupo absorve os metais através da água que vivem e dos alimentos que consomem (TAO et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

O conhecimento epidemiológico dos fatores causadores de doenças e suas interações com os hospedeiros é essencial para avaliar o risco e o impacto das enfermidades na biodiversidade. Sem esse conhecimento, os esforços de conservação correm o risco de falhar e podem resultar na morte de animais translocados ou na introdução de doenças em habitats não afetados. Compreender os processos das doenças em peixes é fundamental para proteger nossa biodiversidade em meio à constante degradação ambiental (CATÃO-DIAS, 2003).

1.1 HIPÓTESES

- Peixes intoxicados com maiores doses de cobre e chumbo apresentam maior efeito sob os biomarcadores (glutathione S-transferase, malondialdeído, acetilcolinesterase e catalase);
- Peixes intoxicados com maiores doses de cobre e chumbo apresentam lesões histopatológicas mais acentuadas, principalmente em fígado, rim, encéfalo e brânquias comparados ao grupo controle.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Analisar os efeitos tóxicos do cobre e chumbo, em peixes e caracterizar os achados hematológicos e anatomopatológicos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar os efeitos tóxicos individuais ao cobre e chumbo através da resposta dos biomarcadores, catalase, glutathione S-transferase e acetilcolinesterase, em brânquias, fígado e cérebro;
- Classificar as alterações hematológicas a partir da realização de hemograma;
- Caracterizar as lesões macroscópicas e histopatológicas, bem como, os órgãos mais afetados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Intoxicação por metais em peixes

Os metais estão presentes no ambiente de diversas formas, seja de origem geogênica (natural) ou antrópica (artificial). Na natureza, os metais chegam às águas principalmente através da lixiviação de rochas e do solo onde estão naturalmente (GARCÍA-ORDIALES et al., 2016). A ação antropogênica tem fundamental importância para a introdução dessas substâncias no meio aquático, sendo principalmente através de resíduos domésticos, efluentes industriais, atividades agrícolas (muitos metais estão presentes em fertilizantes e agrotóxicos) e rejeitos da exploração mineral (LI et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

A contaminação por metais é uma das fontes inorgânicas de poluição mais preocupantes, uma vez que, suas fontes de contaminação estão ligadas ao crescimento produtivo e urbano, tendo em vista que são considerados contaminantes persistentes, a capacidade de bioacumulação e bioamplificação desses metais ao longo da cadeia alimentar se torna uma preocupação quanto à qualidade da água, biodiversidade e também na produção de produtos destinados ao consumo humano (GARCÍA-ORDIALES et al., 2016; IOANNIDES et al., 2015; LOTZE et al., 2006).

A absorção de metais pelos organismos aquáticos varia de acordo com o nível trófico e é influenciada por uma série de fatores, incluindo a espécie, o habitat na coluna d'água, a idade, o tamanho, as características fisiológicas e a forma química específica do metal em questão (SALOMONS; FORSTNER, 1984). A acumulação de metais em animais aquáticos e plantas pode ocorrer por meio de diferentes vias, como absorção cutânea, estruturas respiratórias e ingestão, o que desencadeia processos de toxicidade (TORRES et al., 2008). A toxicidade está diretamente relacionada ao tempo de exposição e aos níveis de concentração. Quanto maior o período de contato com o metal e sua concentração, mais variados serão os efeitos no organismo, abrangendo desde impactos na reprodução até alterações morfológicas (CONNELL; MILLER, 1984).

Os peixes são frequentemente utilizados como modelos biológicos para o estudo da toxicidade de metais e outros agentes no ambiente aquático. Essa escolha é fundamentada em diversas características distintivas desse grupo, incluindo

tamanho, ciclo de vida, distribuição geográfica, diferentes níveis tróficos e capacidade de concentrar metais residuais. Esses atributos permitem uma avaliação mais precisa dos efeitos de bioacumulação e biomagnificação quando comparados a espécies menos complexas. (ENEJI; SHA'ATO, 2011; JIANG et al., 2022). Ainda, pela proximidade desses animais com os sedimentos do leito e dos resíduos acumulados na água, os peixes tem papel fundamental na avaliação de possíveis ameaças à saúde humana, servindo como bioindicadores (GABRIEL et al., 2020).

2.2 Cobre

Um destaque especial deve ser dado ao cobre entre os minerais, pois é um elemento essencial que desempenha um papel vital em inúmeras enzimas envolvidas em importantes processos de oxidorredução (LALL, 2002). Especificamente, esse mineral é um componente essencial em diversas metaloenzimas que desempenham funções essenciais no organismo, tais como a produção de energia celular (citocromo c oxidase), a proteção contra radicais livres (superóxido dismutase), a neurotransmissão no cérebro (dopamina hidroxilase e peptidil α -amidating monooxygenase), a síntese de colágeno (lisil oxidase) e a produção de melanina (tirosinase) (LALL, 2002).

Embora o cobre seja um nutriente essencial para o metabolismo celular, ele pode se tornar tóxico para os animais quando está presente em níveis elevados, especialmente em sua forma livre, a qual é altamente prejudicial às células. A intoxicação por cobre pode ocorrer tanto de forma crônica quanto aguda, resultando em efeitos oxidativos nos tecidos. Normalmente, o cobre livre dentro das células é mantido em baixas concentrações; no entanto, quando sua concentração ultrapassa a homeostase, esse mineral pode interferir nas funções celulares ao se ligar a proteínas e ácidos nucleicos, além de gerar espécies reativas de oxigênio e radicais hidroxila. Esses radicais podem causar peroxidação lipídica nas membranas celulares, clivagem dos ácidos nucleicos e oxidação das proteínas celulares (VIARENGO et al., 2002).

Os peixes, assim como os invertebrados, são impactados pela alta concentração de cobre nos ambientes aquáticos. Em águas doces, o cobre é altamente tóxico, perdendo apenas para o mercúrio, enquanto em ambientes marinhos, sua toxicidade é reduzida devido às atividades de complexação com sais

dissolvidos na água. A exposição a doses entre 0,02 - 0,2 mg/L de cobre revela efeitos adversos em certas espécies de peixes, como redução da expectativa de vida, crescimento e taxa de reprodução. Além disso, o pH do sangue e o consumo de oxigênio são afetados, apresentando valores acima do normal (EISLER; GARDNER, 1973).

As brânquias são os primeiros órgãos a sofrerem os efeitos tóxicos do cobre, com precipitação de secreções nos tecidos branquiais, o que dificulta o processo respiratório. Além disso, ocorre estímulo na divisão celular do epitélio respiratório, resultando em deficiência na produção de células sanguíneas e redução da atividade oxidativa. Outros órgãos também são afetados, com morte celular ocorrendo principalmente nos rins e no fígado, este último devido à degeneração do tecido gorduroso presente no órgão (EISLER; GARDNER, 1973; MACHADO, 1999).

2.3 Chumbo

O chumbo é um elemento naturalmente presente na crosta terrestre, ocorrendo principalmente como sulfeto de chumbo (galena) e em concentrações de aproximadamente 13 ppm (13 mg/kg). No entanto, foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos elementos químicos mais perigosos para a saúde humana (VANZ et al., 2003).

Os contaminantes transferidos pela cadeia alimentar desempenham um papel importante na ação e persistência do chumbo nos ecossistemas. Esse metal pode se acumular lentamente nos tecidos dos organismos ao longo do tempo, inicialmente com baixa toxicidade, mas atingindo níveis danosos e até mesmo letais. A transferência do chumbo dos tecidos dos organismos para seus predadores resulta em concentrações ainda maiores nos níveis tróficos superiores, devido à sua capacidade de acumulação (LEMOS & TERRA, 2003).

A toxicidade da maioria dos metais afeta vários sistemas orgânicos, com alvos específicos sendo processos bioquímicos (enzimas) e/ou membranas de células e organelas. O efeito tóxico do chumbo geralmente envolve uma interação entre o íon metálico livre e o alvo toxicológico (FIRJAN, 2000). Ao contrário de outros metais, como ferro, zinco, cobalto, cromo, manganês e cobre, o chumbo é um elemento completamente estranho ao metabolismo dos seres vivos, em qualquer quantidade.

Ele é uma neurotoxina que, a partir de uma concentração limiar, interfere em várias vias metabólicas, resultando nos sinais e sintomas da doença conhecida como saturnismo (em seres humanos) ou intoxicação crônica por chumbo (CORDEIRO et al., 1996).

A presença do chumbo em diferentes partes do organismo depende inicialmente da taxa de distribuição através do fluxo sanguíneo para vários órgãos e tecidos. Posteriormente, ocorre uma redistribuição com base na afinidade relativa do elemento pelos tecidos e sua toxicodinâmica (ATSDR, 1999). O chumbo se distribui nos tecidos orgânicos, sendo os eritrócitos as células preferenciais para a deposição desse metal. Estima-se que cerca de 90% do chumbo absorvido esteja nos eritrócitos, principalmente ligado à hemoglobina (SPINOSA et al., 2008). O chumbo interfere nas vias metabólicas de síntese de hemoglobina e na maturação normal dos eritrócitos, tornando-os mais frágeis, com redução do tempo de vida e capacidade reduzida de transportar oxigênio (GFELLER & MESSONNIER, 2006). O chumbo presente no sangue é distribuído entre os órgãos, dependendo do gradiente de concentração e da afinidade pelo tecido específico. Ele é distribuído entre o sangue, tecidos moles (como fígado e rins) e tecidos rígidos (como ossos e dentes) (ATSDR, 1999; WHO, 1995).

O chumbo tem uma forte adsorção à matéria orgânica e, embora seja pouco suscetível à lixiviação, pode entrar nas águas superficiais devido à erosão do solo. O movimento do chumbo do solo para as águas subterrâneas é geralmente lento, exceto em condições de alta acidez. Várias condições podem levar à mobilização do chumbo, com a presença de concentrações elevadas do metal no solo, que se aproximam ou excedem a capacidade de troca catiônica do solo; a presença de substâncias que formam quelatos solúveis com o chumbo; e a diminuição do pH da solução lixiviada (como ocorre em chuvas ácidas). Os ecossistemas aquáticos, em geral, atuam como receptores finais de diferentes substâncias químicas, mesmo aquelas que não são lançadas diretamente nos corpos d'água. Portanto, o chumbo presente no ambiente aquático pode ser proveniente da atmosfera, lixiviação do solo ou descarte direto de contaminantes. Nesse meio, o metal é rapidamente dividido entre o sedimento e a fase aquosa, dependendo do pH da água, da presença de sais dissolvidos e de agentes complexantes orgânicos (ATSDR, 2007). No entanto, em ecossistemas aquáticos contaminados, apenas uma pequena fração do chumbo está dissolvida na água, enquanto a maior parte está fortemente ligada ao sedimento. Os organismos

aquáticos geralmente incorporam o chumbo do ambiente proporcionalmente ao grau de contaminação de seu habitat. Concentrações de chumbo em alguns peixes marinhos são mais altas nas brânquias e na pele do que em outros tecidos, enquanto no fígado, os níveis aumentam significativamente com a idade (PAOLIELLO & CAPITANA, 2003).

ARTIGO - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, HEMATOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR COBRE E CHUMBO EM CARPA-CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por metais é um problema global que cresce através da ação antropogênica através da deposição de produtos metálicos no solo, ar ou ambiente aquático (SHAHJAHAN et al., 2022; SOUZA; MORASSUTI; DEUS, 2018). Os estudos toxicológicos destacam os peixes como organismos ideais, desempenhando um papel crucial na cadeia alimentar (ALIKO et al., 2019; SULA et al., 2020). Esses indivíduos, sensíveis às alterações ambientais, emergem como indicadores essenciais no monitoramento do ecossistema aquático. Sua capacidade eficiente de metabolizar e acumular metais no organismo torna-os fundamentais nesse contexto (GARCÍA-ORDIALES et al., 2016; IOANNIDES et al., 2015; LOTZE et al., 2006).

O acúmulo desses metais em diferentes tecidos corporais resulta da entrada por meio da alimentação, absorção de água para respiração ou troca iônica através de membranas semipermeáveis (TORRES et al. 2008). Isso ressalta a importância dos peixes não apenas como elementos-chave na cadeia alimentar, mas também como indicadores vitais das condições do ecossistema aquático. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos tóxicos do cobre e do chumbo no metabolismo oxidativo, padrão hematológico e anatomopatológico em carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) durante a intoxicação aguda.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), na cidade de Lages, Santa Catarina, Brasil (Latitude: 27° 49' 0" Sul, Longitude: 50° 19' 35" Oeste). Para avaliação dos parâmetros, utilizou-se de 56 juvenis de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*), adquiridos de piscicultor comercial. Os peixes, de ambos os sexos, apresentavam em média 126,19g ($\pm 31,98$) e 22,23cm ($\pm 1,75$) e foram aclimatados por um período de sete dias no Laboratório de Toxicologia Ambiental – UDESC/CAV. As carpas-capim foram divididas randomicamente em aquários de 50L, cada um com dois animais. Durante a aclimação, era realizada a troca diária da água dos aquários, alimentação

ad libitum com azevém anual (*Lolium multiflorum*) e aeração constante. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA-UDESC), nº 2182300723.

2.1 TESTE DE INTOXICAÇÃO

Após a aclimação, os peixes foram submetidos ao teste de intoxicação aguda (96h), constituindo sete grupos distintos cada um com oito indivíduos, sendo um controle (Tabela 1). Os testes foram realizados em quatro momentos (com as mesmas condições ambientais), com o objetivo de permitir uma melhor organização no momento das análises, dessa forma, os animais foram divididos randomicamente, com início do período de teste em quatro dias diferentes, assim, no final de cada 96h, 14 peixes eram eutanasiados. Para os testes, foram utilizados Sulfato de Cobre e Solução de Chumbo.

Tabela 1. Teste de toxicidade aguda para cobre (Cu) e chumbo (Pb) em *Ctenopharyngodon idella*, concentração dos metais para cada grupo.

Grupo	Sigla	Quantidade (mg/L)
Controle	C	0,0
Cobre 2	Cu2	2,0
Cobre 3	Cu3	3,0
Cobre 4	Cu4	4,0
Chumbo 2	Pb2	2,0
Chumbo 3	Pb3	3,0
Chumbo 4	Pb4	4,0

2.2 HEMATOLOGIA

2.3

Amostras de sangue foram colhidas após as 96h do período de intoxicação, anterior a eutanásia, através da venopunção caudal com seringa de 3mL heparinizada e agulha hipodérmica 20x5,5 24g. Após a colheita das amostras, foram enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas – UDESC/CAV, mantidas refrigeradas, para a realização do hemograma, teste de fragilidade osmótica eritrocitária e determinação da glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA) eritrocitários.

2.2.1 Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária

Para a realização do teste de fragilidade osmótica eritrocitária, 20 µL de sangue total heparinizado foram adicionados a 5,0 mL de uma solução tamponada de cloreto

de sódio (NaCl) com pH 7,4, em concentrações específicas: 0,85%, 0,80%, 0,75%, 0,70%, 0,65%, 0,60%, 0,55%, 0,50%, 0,45%, 0,40%, 0,35%, 0,30%, 0,25%, 0,20%, 0,10% e 0,00%. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 3500rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria a 546nm contra água deionizada, seguindo a metodologia proposta por Parpart et al. (1947). O resultado deste ensaio expressa a concentração de NaCl correspondente a 50% de hemólise (H50), calculada a partir da curva dos percentuais de hemólise nas diferentes concentrações, ajustada por um modelo linear generalizado para proporções, utilizando a função de ligação Probit (McCULLOCH & SEARLE, 2001).

2.2.2 Determinação da Glutathiona Eritrocitária

Para avaliação da glutathiona eritrocitária, foram adicionados 200µL de sangue total heparinizado a 1,8mL de água purificada, seguido da adição de 3mL de solução precipitante ao hemolisado e posterior repouso por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 3000rpm por 5 minutos. Utilizando 200µL do sobrenadante, somado a 800µL da solução de fosfato e 100µL de DTNB, seguido de leitura em espectrofotômetro a 412nm.

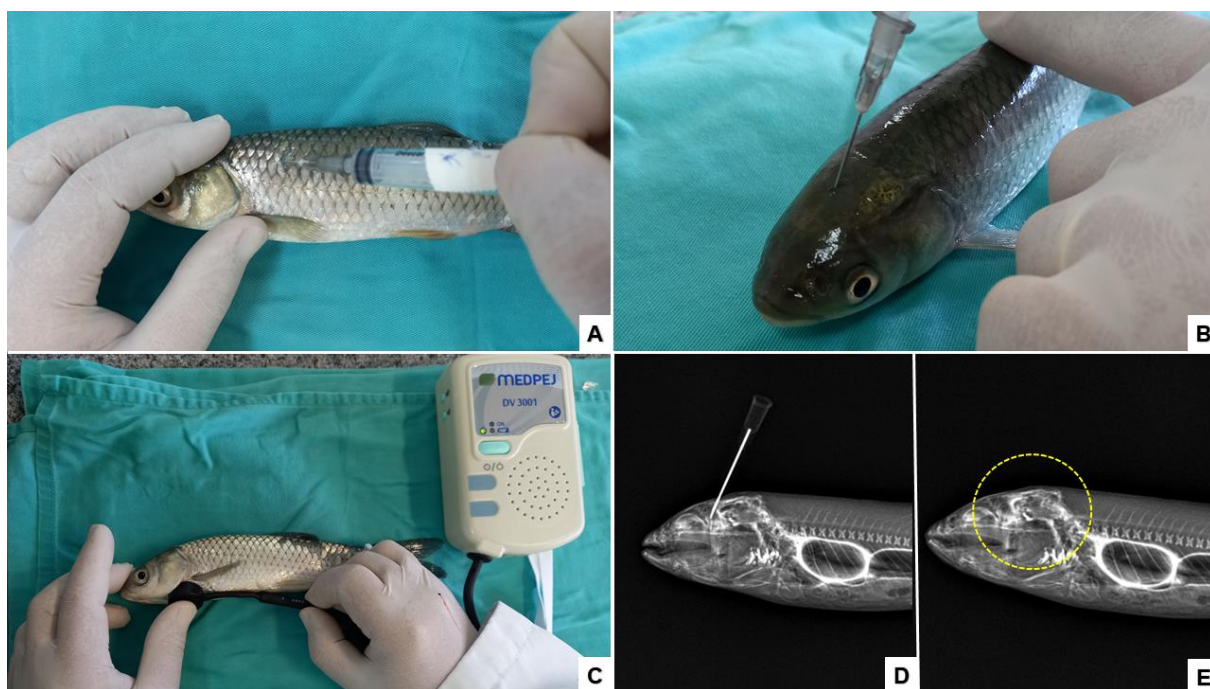
2.2.3 Determinação do Malondialdeído Eritrocitário

Para avaliação do malondialdeído eritrocitário, iniciou-se com a centrifugação das amostras por 10 minutos em 2200 rpm, seguida da retirada do plasma e papa de leucócitos e lavagem com PBS (pH 7,4) três vezes. Para análise das amostras, foram adicionados 100 µl da papa de hemácias, 900 µl de PBS e para avaliação pós lipoperoxidação, 100 µl de hidroperóxido de T-butil. Após incubação a 37°C por 60 minutos, inclui-se 1mL de ácido tricloroacético a 28% nos tubos, homogeneizados em agitador tipo vórtex, seguido de centrifugação a 1000rpm por 15 minutos. Separado 1 mL do sobrenadante, somado a 100 µl de BHT, 500 µl DE TBA a 1% e 500 µl de ácido clorídrico a 25%. Incubados a 95°C por 15 minutos, resfriados em banho de gelo e seguido da adição de n-butanol, centrifugador por 15 minutos a 3500 rpm e por fim, realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 nm contra o branco.

2.3 EUTANÁSIA

A eutanásia dos peixes foi realizada de acordo com a normativa 037/2018 - CONCEA do Ministério de Ciência e tecnologia com a utilização de Cloridrato de cetamina 5%, Cristália®, Itapira, SP), na dose de 30mg/kg, intramuscular; e xilazina (Syntec®, Santana de Parnaíba, SP), 5mg/kg, intramuscular sempre no lado esquerdo (Figura 1.A), seguido de Lidocaína 2% (Xylestesin, Cristália®, Itapira – SP) na dose 1mg/Kg via intratecal (Figura 1.B,D e E) até a parada completa dos batimentos cardíacos monitorada por doppler ultrassônico ® (Medpej, Ribeirão Preto, SP) (Figura 1.C).

Figura 1. Técnica de eutanásia em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). A) Anestesia com cetamina e xilazina, intramuscular. B) Aplicação de lidocaína via intratecal. C) Monitoração dos batimentos cardíacos com doppler ultrassônico, para confirmação do óbito. D e E) Radiografia do local da punção intratecal para comprovação do acesso.



Fonte: a própria autora.

2.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

Posterior a eutanásia, os animais foram pesados e medidos, e na sequência, a necropsia foi realizada (Figura 2.A). Iniciando pela inspeção externa, seguido pela abertura da cavidade através da incisão ventral mediana (Figura 2.B). Os órgãos

foram retirados em um monobloco e avaliados separadamente (Figura 2.C). Para avaliação histopatológica, foram colhidas amostras de encéfalo, brânquias, coração, fígado, rins, baço, bulbo intestinal, intestinos, pele e músculo esquelético e fixadas em formalina tamponada 10% por 24h (Figura 2.D). Posteriormente realizado processamento de rotina para histologia no Laboratório de Produção e Sanidade Animal (PROS-UDESC), seguido pelas colorações de Hematoxilina e Eosina, Rodonina e Ziehl Neelsen, tendo os últimos como objetivo observar os acúmulos de cobre e chumbo, respectivamente, nos tecidos. As técnicas histoquímicas seguiram os protocolos estabelecidos pela Armed Forces Institute of Pathology (AFIP).

2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO

Para avaliação do metabolismo oxidativo de brânquias, fígado, rins e encéfalo, as amostras foram processadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental – UDESC.

2.5.1 Catalase

Para a determinação da atividade da catalase de fígado, brânquias e rins, foi utilizada a metodologia de Beutler (1975). Para o ensaio, foram homogeneizados em cubetas de quartzo de 4 mL, 20 µL do homogeneizado da amostra, 20 µL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de solução tampão (Tris HCl 1M e EDTA 5 mM). Na etapa subsequente, a cinética foi registrada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm.

2.5.2 Glutathione S-transferase

A determinação da atividade da glutathione-S-transferase em fígado, brânquias e rins, segue metodologia proposta por Keen, Habig e Jakoby (1976), consistindo na complexação de glutathione reduzida (GSH) com o substrato (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), que é catalisada pela GST presente na amostra. No ensaio, adicionou-se 2 mL do tampão de reação, 20 µL de CDNB, 20 µL de glutathione reduzida (GSH) e 20 µL da amostra. A leitura foi realizada com espectrofotometria em 340 nm.

2.5.3 Acetilcolinesterase

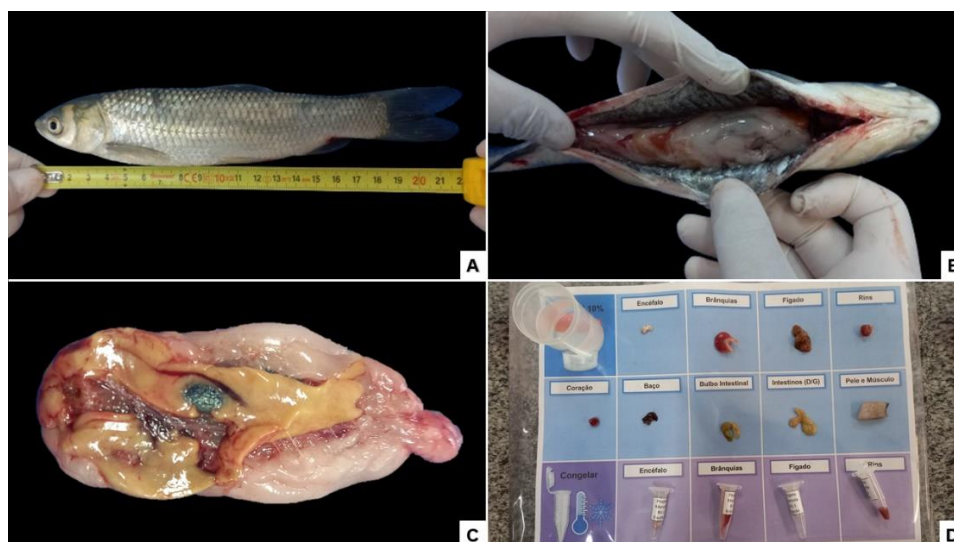
Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase no encéfalo, foi adotado o método de Ellman et al. (1961), baseado na medição da taxa de produção de tiocolina. Como substrato, foi utilizado 100 µL de iodeto de acetilcolina, 100 µL do

reagente de cor 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 100 μ L do homogeneizado da amostra e 2 mL de tampão fosfato monopotássio (0,1 M e pH 7,0). A absorbância foi lida através da espectrofotometria a cada 30 segundos ao longo de 2 minutos a 412 nm.

2.5.4 Proteínas totais

As proteínas totais de fígado, brânquias, rins e encéfalo foram determinadas com base no método de biureto, que consiste na utilização do reagente, que em contato com as proteínas da amostra, forma um complexo de cor azul, sendo proporcional a concentração proteica da amostra. Nas cubetas de 4 mL, foram adicionados 2 mL do reagente de biureto e 50 μ L do homogeneizado das amostras. Sendo o tubo padrão com 2 mL do reagente de biureto e 0,2 mL do reagente de cor. A leitura do padrão e da amostra foi feita a 545 nm no espectrofotômetro, com correção do zero utilizando a amostra branca.

Figura 2. Metodologia utilizada para a necropsia de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). A) Medição do comprimento entre boca e cauda. B e C) Abertura da cavidade através de incisão ventral mediana e monobloco de órgãos para avaliação macroscópica. D) Planejamento utilizado para coleta das amostras para histologia e toxicologia.



Fonte: a própria autora.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados descritivos foram apresentados em média e desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-

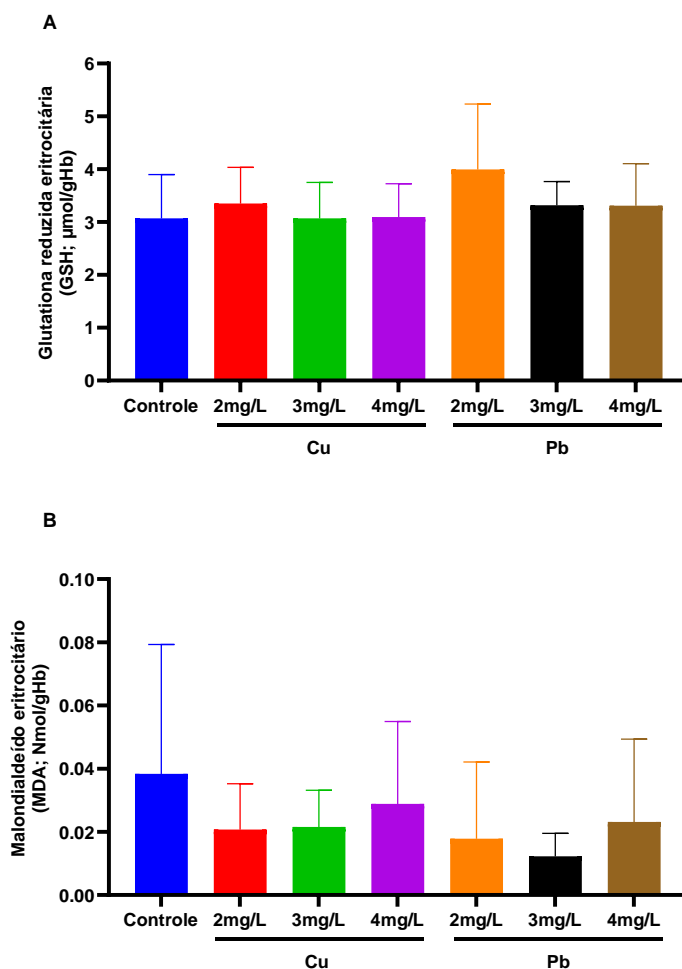
Smirnov e apresentaram distribuição normal, portanto foram utilizados testes paramétricos para as análises. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma via com pós teste de Tukey para a comparação entre as concentrações de cada um dos metais. As análises foram realizadas considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 10.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações hematológicas (Tabela 2) demonstraram diferenças significativas estatisticamente para o valor de eritrócitos no grupo Pb2, que foi menor que o do grupo controle, fato que está possivelmente relacionado, primeiramente com a inibição na atividade da enzima ácido - aminolevulínico (δ -ALAD) e a morte de eritrócitos maduros (ADEYEMO, 2007), essa alteração pode ser observada também em *Chanos chanos* (milkfish) expostos a nitrato de chumbo (ZULFAHMI et al., 2021), *Channa punctatus* (DUTTA; RANI SARMA; DEKA, 2015) e *Clarias gariepinus* (bagre-africano) na intoxicação aguda por chumbo (ADEYEMO, 2007). De forma geral, mesmo que sem diferenças estatísticas significativas para todas as concentrações, os três grupos intoxicados com Pb apresentaram um menor valor total de eritrócitos, o que possivelmente acompanha os efeitos de inibição e morte celular citados anteriormente.

Nos demais parâmetros hematológicos, apesar de não apresentarem diferença estatística, pode-se observar diferenças numéricas em determinados grupos. Como por exemplo, a redução no número de neutrófilos para os animais dos grupos Cu2, 3 e 4, em relação ao grupo controle que também foi observado em *Colisa fasciatus* em intoxicação aguda por cobre (MISHRA; SRIVASTAVA; RECEITVD, 1980). Em contraponto com o aumento dessas células nos grupos Pb2, 3 e 4, que corrobora com os achados em *Channa punctatus* (DUTTA; RANI SARMA; DEKA, 2015), esse achado pode ser justificado pela estimulação do sistema imune em resposta as lesões causadas pelo chumbo, entretanto, caso ocorresse a cronicidade dessa exposição, poderia desencadear uma supressão dessa resposta, tornando a espécie susceptível as mudanças ambientais ou mesmo infecções (GILL; PANT, 1985).

Figura 3. Avaliação do estresse oxidativo da (A) Glutathiona reduzida eritrocitária (GSH) e (B) Malondialdeído eritrocitário (MDA) de 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).



Fonte: a própria autora.

Quanto a avaliação da atividade de GSH e MDA eritrocitários (Figura 3), apesar de não haver diferença significativa, observou-se alteração no metabolismo oxidativo nos animais intoxicados em comparação ao grupo controle. Assim, para os grupos Cu2, 3 e 4, a GSH permaneceu semelhante ao grupo controle e não houve diferença entre as concentrações de Cu, porém, para MDA observou-se um aumento no grupo Cu4, sendo um dos principais produtos da peroxidação lipídica (TSIKAS, 2017), o aumento na quantidade de MDA sugere um aumento no metabolismo oxidativo. O valor aumentado de MDA do grupo controle pode ser explicado pela presença de *Ichthyophthirius multifiliis* em alguns indivíduos do grupo, que pode ter induzido uma

maior peroxidação lipídica. Para os peixes intoxicados por chumbo, houve aumento da GSH em relação ao grupo controle e redução da MDA, o que indica que a GSH está respondendo a lesão causada pelo chumbo e suprimindo a demanda como antioxidante, dessa forma, há alteração no metabolismo oxidativo, mas ainda o organismo está conseguindo manter suas funções, isso ocorre devido o estímulo da síntese de GSH pelos metais (SUKHOVSKAYA et al., 2017).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros de eritrograma, leucograma, contagem trombocitária e mensuração da proteína plasmática total de 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8). *p<0,05 entre as concentrações sinalizadas

	Controle	Cu			p	Pb			p
		2mg/L	3mg/L	4mg/L		2mg/L	3mg/L	4mg/L	
Proteína total plasmática (g/dL)	4,6 (0,8)	5,2 (0,4)	5,1 (0,7)	4,6 (0,4)	0,147	4,6 (0,8)	4,7 (0,7)	4,9 (0,6)	0,740
Eritrócitos (x10⁶/μL)	1,62 (0,60)	1,40 (0,71)	1,39 (0,53)	1,11 (0,48)	0,402	0,94 (0,44)*	1,11 (0,58)	1,03 (0,24)	0,043
Hemoglobina (g/dL)	6,47 (0,63)	6,83 (0,70)	6,85 (0,78)	6,57 (0,87)	0,707	6,50 (1,23)	6,92 (0,88)	7,15 (1,08)	0,454
Hematócrito (%)	35 (5)	40 (6)	40 (5)	34 (6)	0,075	34 (9)	35 (6)	38 (6)	0,768
Volume globular médio (VGM; fL)	241,2 (99,9)	347,8 (158,2)	323,7 (124,6)	350,7 (141,4)	0,336	408,2 (138,2)	392,4 (186,2)	383,9 (122,9)	0,086
Concentração de hemoglobina globular média (CHGM; %)	18,96 (2,53)	17,14 (2,56)	17,38 (1,28)	19,79 (2,28)	0,091	19,80 (3,39)	20,16 (3,05)	19,19 (2,05)	0,820
Trombócitos (x10³)	36.230 (35.279)	33.645 (36.403)	44.627 (37.013)	35.067 (33.931)	0,937	27.067 (29739)	32.036 (37.482)	35.516 (36421)	0,950
Leucócitos totais (células/μL)	22.928 (8.258)	24.564 (14.778)	25.093 (11.270)	19.214 (7.942)	0,707	22.033 (14.260)	26.328 (16.880)	27.978 (11.594)	0,779
Linfócitos	14.903 (6.749)	17.365 (10.678)	18.363 (8.449)	13.701 (6.103)	0,664	14.766 (8.499)	17.492 (10.271)	16.955 (8.367)	0,886
Neutrófilos	6.585 (3.295)	4.630 (3.050)	4.467 (4.367)	3.196 (1.215)	0,217	4.989 (5.226)	5.894 (5.685)	7.682 (3.309)	0,680
Monócitos	1.393 (684)	2.349 (2.271)	1.985 (1.356)	1.942 (1.527)	0,688	2.116 (1.640)	2.838 (3.723)	3.163 (2.618)	0,487
Eosinófilos	378 (0)	383 (358)	969 (1.068)	998 (908)	0,652	325 (394)	278 (156)	473 (334)	0,892

Fonte: a própria autora.

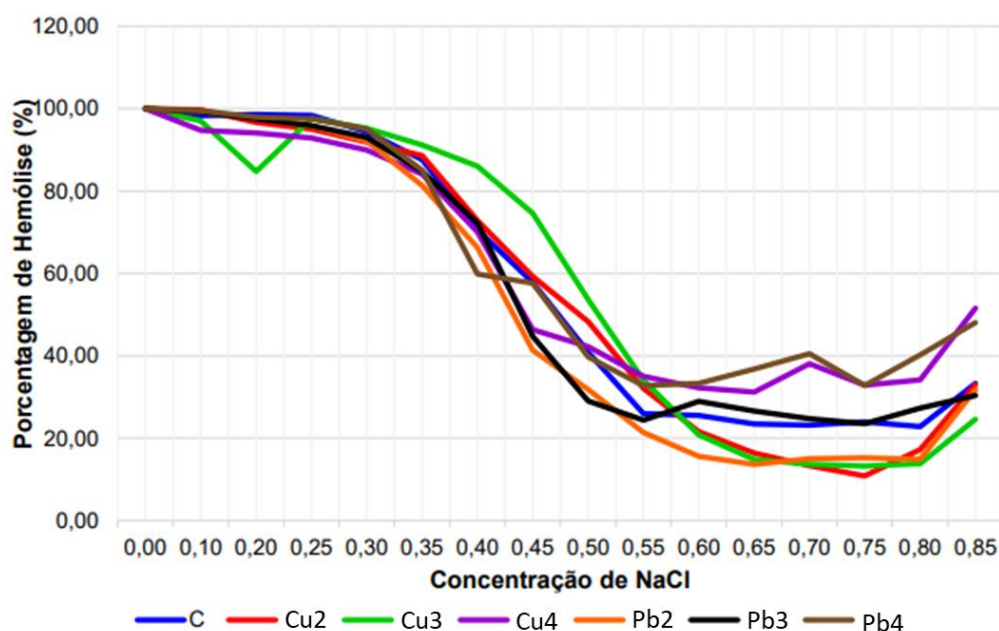
Quanto a fragilidade osmótica eritrocitária, não houve diferença significativa entre os grupos, porém, pode-se observar uma maior fragilidade osmótica eritrocitária em ambos os metais nas suas maiores concentrações em relação ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 4), indicando que apesar de não haver diferença estatística, a presença desses metais ocasiona um maior desequilíbrio na manutenção da membrana celular e facilita a hemólise eritrocitária (ROSENBERG et al., 1998).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão das concentrações de NaCl com 50% de hemólise em 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).

	Controle	Cu			Pb		
		2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L
H50%	0,58	0,55	0,59	0,60	0,52	0,56	0,63

Fonte: a própria autora.

Figura 4. Valores médios de hemólise em diferentes concentrações de NaCl em 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).



Fonte: a própria autora.

Fonte: a própria autora.

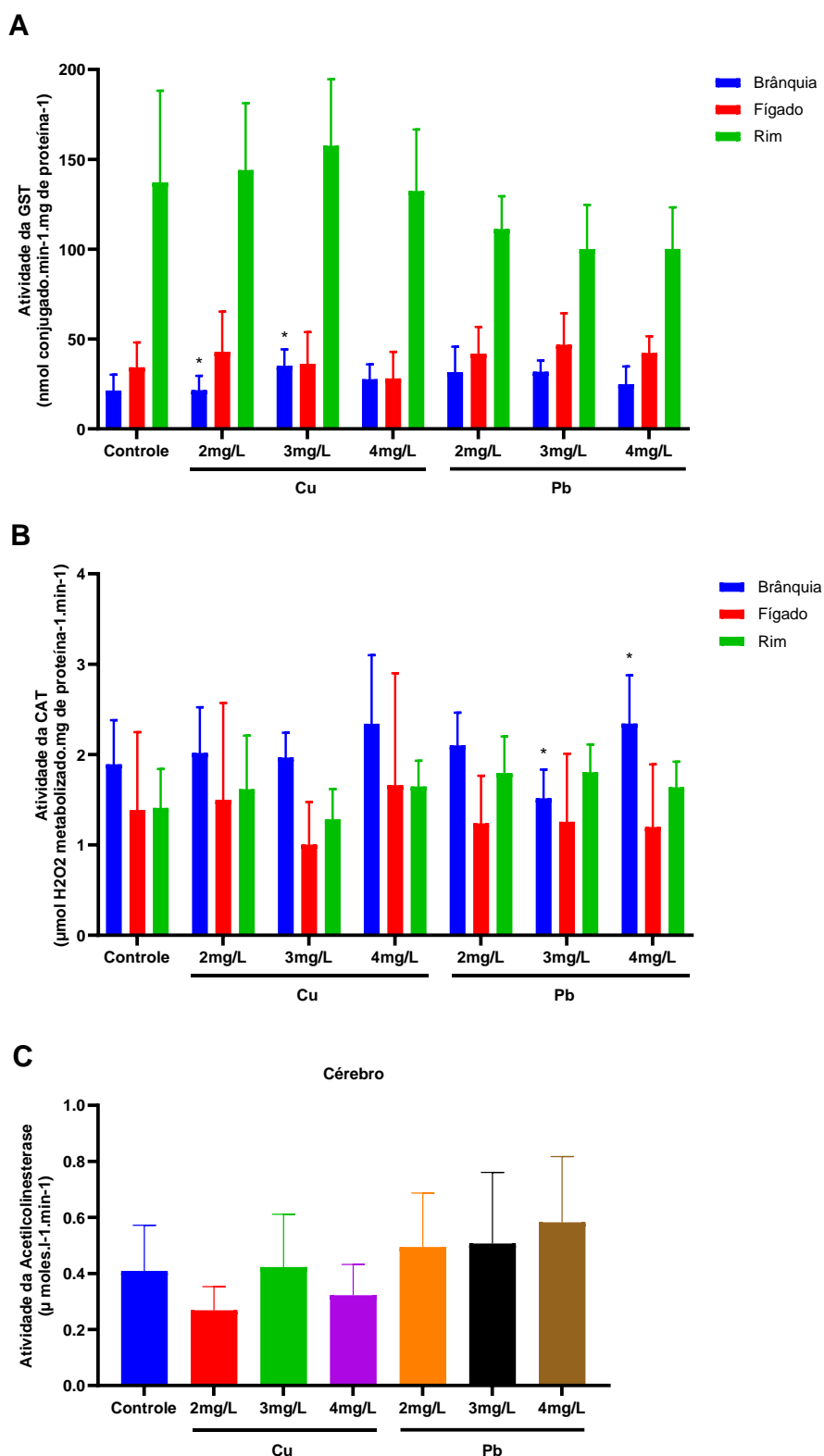
A dosagem dos marcadores bioquímicos em tecidos (Figura 5) demonstrou diferença significativa apenas para a GST das brânquias nas concentrações de 2 e 3

mg/L de cobre, entretanto, houve aumento numérico da atividade da GST branquial nos grupos Pb também. As brânquias são na maioria das vezes o órgão de contato inicial com os contaminantes, possuindo alta sensibilidade a estes. Da mesma forma, quando expostas a concentrações de cobre capaz de lesioná-las, as enzimas com capacidade antioxidante, como a GSH, tendem a aumentar sua atividade a fim de solucionar e inibir o estímulo estressor (LIU et al., 2006; NAGALAKSHMI; PRASAD, 2001).

Quanto a catalase branquial, houve aumento da atividade em todos os grupos, indicando maior metabolismo oxidativo. Já para a catalase renal, há aumento nos grupos Pb, indicando também maior atividade na degradação de peróxido de hidrogênio. Essa manifestação está de acordo com o observado em demais estudos na avaliação da atividade da catalase em casos de exposição a metais tóxicos (KOVACIK, 2017; VUTUKURU et al., 2006)

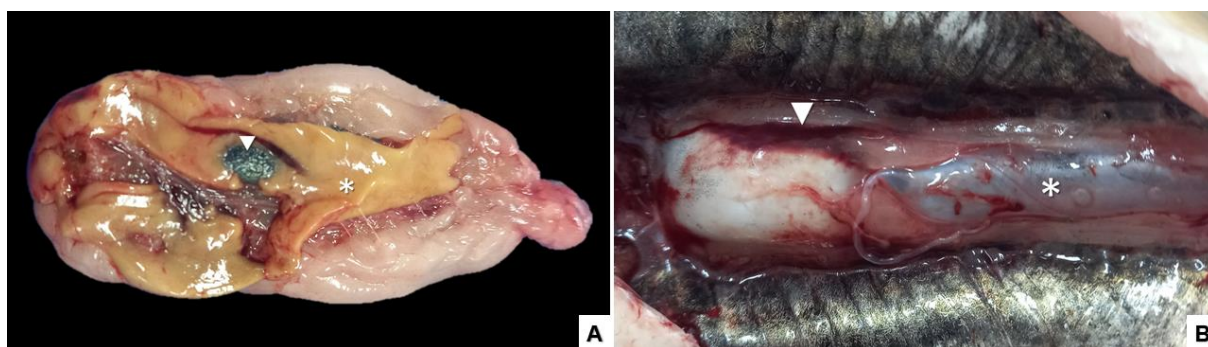
Apesar de não haver diferença significativa entre a atividade da acetilcolinesterase nos grupos, observou-se uma maior atividade da enzima nos grupos Pb, proporcionalmente a concentração do metal, indicando maior metabolismo oxidativo nesses casos. Infere-se que essa manifestação está relacionada a ação do chumbo no sistema nervoso animal, que interfere nas vias colinérgicas ao competir com cálcio, causando uma maior liberação de acetilcolina, uma vez ocorrendo esse aumento, mas não em quantidade suficiente para causar a inibição da acetilcolinesterase, a enzima eleva proporcionalmente sua ação na tentativa de estabelecer a homeostase novamente. (GHAREEB et al., 2010; GUPTA et al., 2015; REDDY; DEVI; CHETTY, 2007)

Figura 5. Avaliação toxicológica da atividade de (A) glutathiona-S-transferase (GST), (B) catalase (CAT) em fígado, rins e brânquias e (C) acetilcolinesterase em encéfalo em 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8). *p<0,05 entre as concentrações sinalizadas.



Os achados macroscópicos durante a necropsia mais observados (Figura 6) para os animais intoxicados com cobre, foram: fígado amarelado difuso (16/24); rins com áreas vermelho-escuras (focalmente extensas ou multifocais) (3/24) e hemorragia retroperitoneal focalmente extensa (1/24). Para os indivíduos dos grupos chumbo, as lesões mais observadas foram: fígado amarelado difuso (17/24); rins com áreas avermelhadas (focalmente extensas ou multifocais) (2/24); congestão difusa moderada em brânquias (1/24).

Figura 6. A) Carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Fígado amarelamento difuso e acentuado devido a esteatose (*); vesícula biliar (ponta de seta). B) Carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Rins com áreas vermelho-escuras multifocais moderadas, hemorragia (ponta de seta); bexiga natatória (*).



Fonte: a própria autora.

Na avaliação histopatológica, evidenciou-se lesões acometendo principalmente brânquias, fígado e rins (Figura 7). As lesões branquiais são expressas na Tabela 4, e foram marcadas por infiltrado de linfócitos, macrófagos, e por vezes neutrófilos, em hemibrânquias interna e externa. Esse infiltrado era acompanhado por proliferação do epitélio filamentar, que variou entre parcial, quase total e total, tomando como elemento comparativo, o quanto as lamelas secundárias estavam fusionadas. Ainda, a descamação do epitélio pode ser observada, em diferentes graus. Em alguns casos, foram visualizadas áreas de edema intraepitelial, variando de discreto a moderado.

Tabela 4. Alterações histopatológicas de brânquias de 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).

Grupos	Lesões em brânquias	Nº de animais
Controle	<i>Infiltrado</i>	(8/8)
	Linfocítico e macrofágico multifocal discreto	(4/8)
	Linfocítico, macrofágico e neutrofílico difuso moderado	(4/8)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(8/8)
	Parcial multifocal	(5/8)
	Parcial a quase total multifocal	(3/8)
	<i>Descamação do epitélio variando de discreto a moderado</i>	(6/8)
	<i>Edema discreto</i>	(2/8)
	Estruturas protozoárias compatíveis com <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	(2/8)
Cobre 2mg/L	<i>Infiltrado</i>	(8/8)
	Linfocítico e macrofágico multifocal discreto a moderado	(5/8)
	Linfocítico, macrofágico e neutrofílico multifocal discreto a moderado	(3/8)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(8/8)
	Parcial difuso	(2/8)
	Parcial a quase total multifocal a difuso	(3/8)
	Quase total a total difuso	(3/8)
	<i>Descamação do epitélio variando de discreto a moderado</i>	(6/8)
	<i>Edema moderado</i>	(4/8)
Cobre 3mg/L	<i>Infiltrado</i>	(8/8)

	Linfocítico e macrofágico multifocal discreto a moderado	(5/8)
	Linfocítico, macrofágico e neutrofílico multifocal moderado	(3/8)
		(8/8)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(2/8)
	Parcial a quase total multifocal	(6/8)
	Parcial a quase total difuso	(7/8)
	<i>Descamação do epitélio moderada</i>	(3/8)
	<i>Edema discreto</i>	
	<i>Infiltrado</i>	(8/8)
	Linfocítico e macrofágico multifocal	(8/8)
Cobre 4mg/L	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(8/8)
	Parcial a quase total difuso	(4/8)
	Quase total difuso	(1/8)
	Quase total a total difuso	(3/8)
	<i>Descamação do epitélio variando de discreta a moderada</i>	(8/8)
	<i>Edema variando de discreto a moderado</i>	(3/8)
	<i>Infiltrado</i>	(5/8)
	Linfocítico e macrofágico multifocal	(4/5)
Chumbo 2mg/L	Linfocítico, macrofágico e neutrofílico multifocal	(1/5)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	
	Parcial a quase total multifocal a difuso	(8/8)
		(8/8)
	<i>Descamação do epitélio variando de discreta a moderada</i>	
	Estruturas protozoárias compatíveis com <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	(5/8)
		(1/8)
	<i>Infiltrado</i>	(7/8)
Chumbo 3mg/L	Linfocítico e macrofágico multifocal	(7/8)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(8/8)

Chumbo 4mg/L	Parcial a quase total multifocal a	(7/8)
	difuso	(1/8)
	Quase total a total difuso	(8/8)
	<i>Descamação do epitélio discreta</i>	(3/8)
	<i>Edema discreto a moderado</i>	
	<i>Infiltrado</i>	(7/8)
	Linfocítico e macrofágico multifocal	(7/8)
	<i>Proliferação do epitélio filamentar</i>	(8/8)
	Parcial a quase total difuso	(2/8)
	Quase total a total multifocal a	(6/8)
	difuso	
	<i>Descamação do epitélio discreta a</i>	(8/8)
	<i>moderada</i>	
	<i>Edema discreto a moderado</i>	(2/8)

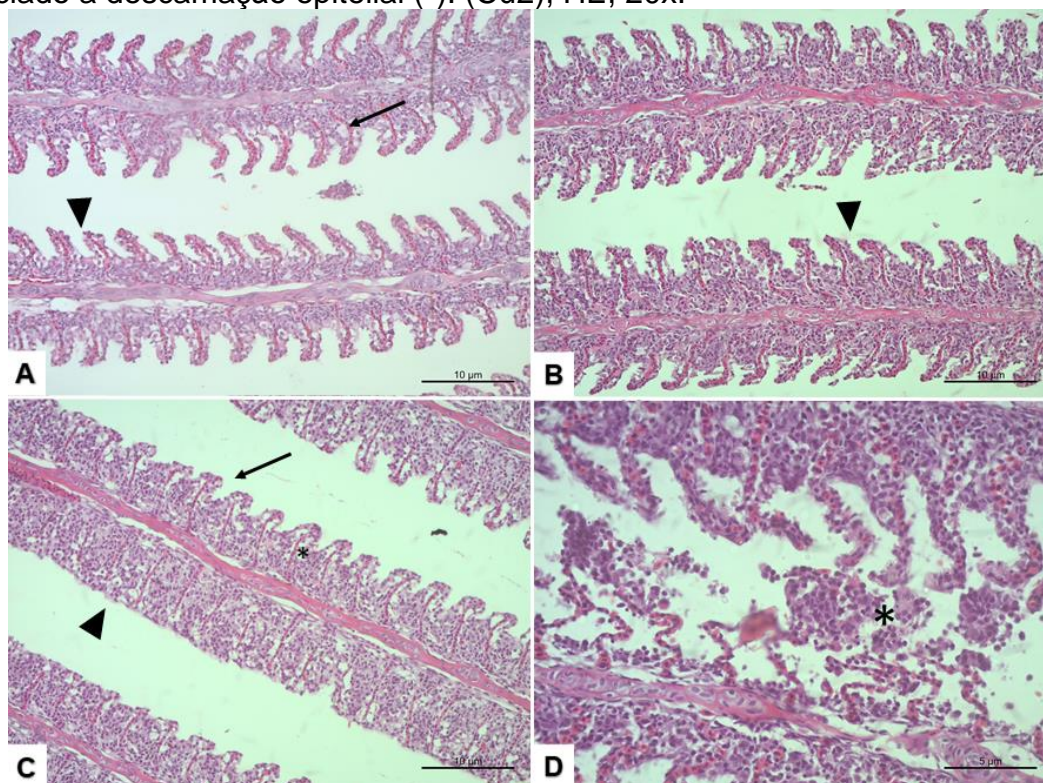
Fonte: a própria autora.

Importante ressaltar os mecanismos de proteção realizados pelas brânquias quando lesionadas ou expostas a agentes tóxicos de forma aguda são observados nos peixes intoxicados tanto por cobre quanto por chumbo, sendo o edema intraepitelial, a fusão das lamelas, a hiperplasia do epitélio e o infiltrado de leucócitos presentes nesses casos (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011; MALLATT, 1985).

Conforme a tabela 4, as lesões histológicas observadas no grupo controle em brânquias podem ser explicadas pela presença de protozoários da espécie *Ichthyophthirius multifiliis*, que podem estar gerando essa resposta do organismo, com o infiltrado Infocítico, macrofágico e neutrofílico e a hiperplasia do epitélio filamentar (MALLATT, 1985). Ainda, cabe ressaltar que todos os animais possuíam a mesma origem e foram aclimatados da mesma maneira, porém, foi observada a presença de *Ichthyophthirius multifiliis* no grupo controle e em um único animal do grupo Pb2, todos sem alterações macroscópicas características da infecção. Infere-se, que o aparecimento do parasito pode estar associado a mudança de ambiente e fatores estressantes que favoreceram o aparecimento da lesão, um ponto interessante a ser observado, é que nos animais contaminados com cobre, não foram observadas estruturas parasitarias na histopatologia. Alguns estudos, demonstram a utilização de sulfato de cobre, em diferentes doses para o controle de *Ichthyophthirius multifiliis*,

possivelmente, a presença do sulfato de cobre nessas concentrações pode ter impedido o desenvolvimento do protozoário, apesar de se tratar de um bioensaio de intoxicação aguda por esse metal (AL-JUBURY et al., 2023; EWING; EWING; ZIMMER, 1982; FARMER et al., 2013; STRAUS, 1993; STRAUS; HOSSAIN; CLARK, 2009)

Figura 7. Fotomicrografia das lesões em brânquias encontradas em carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre e chumbo. A) Proliferação parcial do epitélio filamentar (ponta de seta) e edema intraepitelial (seta). (Cu2) HE, 20x. B) Proliferação do epitélio filamentar quase total (ponta de seta). (Cu4) HE, 20x. C) Proliferação do epitélio filamentar em padrão quase total (seta) e total, com fusão das lamelas secundárias (ponta de seta), além de edema (*). (Cu3), HE, 20x. D) Infiltrado de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, na luz entre lamelas primárias, associado a descamação epitelial (*). (Cu2), HE, 20x.



Fonte: a própria autora.

As lesões hepáticas, conforme a Tabela 5, observadas nos grupos Pb1, 2 e 3, correspondem a lesão hepatocelular causada pelo chumbo, por se tratar de uma intoxicação aguda em concentrações não muito elevadas. Áreas de necrose, fibrose e hemorragias são observadas em casos crônicos (OLOJO et al., 2005; PATNAIK et

al., 2011). A necrose muscular observada em um dos animais do grupo Pb1 corrobora com o observado por (PATNAIK et al., 2011).

Tabela 5. Alterações histopatológicas de 56 carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre (n=24) e chumbo (n=24) em diferentes concentrações e grupo controle (n=8).

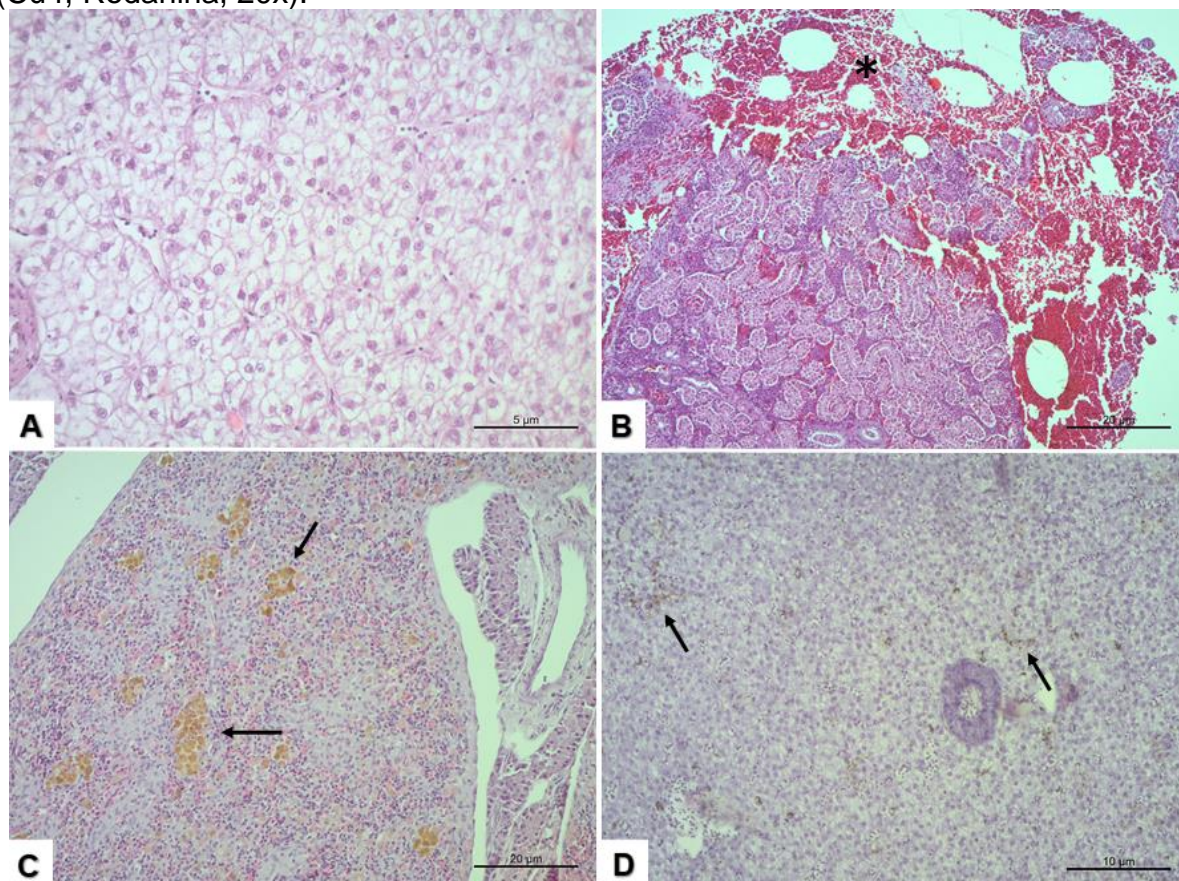
Grupos	Órgãos e suas respectivas lesões	Nº de animais
Controle	<i>Hepatopâncreas</i>	
	Degeneração hepatocelular	(4/8)
	Periportal difusa moderada	(3/4)
	Difusa discreta	(1/4)
Cobre 2mg/L	<i>Hepatopâncreas</i>	
	Degeneração hepatocelular	(7/8)
	Portal difusa moderada	(5/7)
	Difusa discreta	(2/7)
	<i>Rins</i>	
	Hemorragia	(4/8)
	Intersticial e subcapsular multifocal moderada	(2/4)
		(1/4)
	Intersticial multifocal discreta	(1/4)
	Subcapsular focalmente extensa acentuada	(1/8)
	Congestão difusa discreta	
Cobre 3mg/L	<i>Hepatopâncreas</i>	
	Degeneração hepatocelular	(6/8)
	Difusa moderada	(4/6)
	Difusa acentuada	(2/6)
	<i>Rins</i>	
	Hemorragia intersticial multifocal discreta	(3/8)
Cobre 4mg/L	<i>Hepatopâncreas</i>	
	Degeneração hepatocelular	(6/8)
	Difusa moderada	(5/6)
	Difusa discreta	(1/6)

		Rins	
		Hemorragia	(6/8)
		Intersticial multifocal moderada	(4/6)
		Subcapsular multifocal moderada	(3/6)
		<i>Baço</i>	
		Aumento de melanomacrófagos difuso discreto	(1/8)
Chumbo 2mg/L	<i>Encéfalo</i>		
	Edema difuso discreto		(2/8)
	<i>Hepatopâncreas</i>		
	Degeneração hepatocelular		(6/8)
	Difusa moderada		(4/6)
	Difusa acentuada		(2/6)
	<i>Rins</i>		
	Hemorragia		(5/8)
	Intersticial multifocal acentuada		(1/5)
	Intersticial multifocal moderada		(4/5)
	Subcapsular multifocal moderada		(2/5)
	<i>Músculo Esquelético</i>		
	Necrose flocular multifocal moderada		(1/8)
Chumbo 3mg/L	<i>Encéfalo</i>		
	Edema difuso discreto		(1/8)
	<i>Hepatopâncreas</i>		
	Degeneração hepatocelular		(6/8)
	Difusa moderada		(3/6)
	Difusa acentuada		(2/6)
	Difusa discreta		(1/6)
	<i>Rins</i>		
	Hemorragia		(4/8)
	Intersticial multifocal		(4/4)
	Discreta		(2/4)
	Moderada		(1/4)
	Acentuada		(1/4)
	Subcapsular multifocal acentuada		(1/4)

	Congestão difusa moderada	(1/8)
<i>Encéfalo</i>		
	Edema difuso moderado	(1/8)
<i>Hepatopâncreas</i>		
	Degeneração hepatocelular	(6/8)
Chumbo	Hemorragia multifocal discreta	(1/8)
4mg/L	<i>Rins</i>	
	Hemorragia intersticial multifocal moderada	(3/8)
	<i>Baço</i>	
	Aumento no número de melanomacrófagos difuso moderado	(1/8)

Fonte: a própria autora.

Figura 8. Fotomicrografia das principais lesões histopatológicas em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidas a intoxicação aguda por cobre e chumbo. A) Hepatopâncreas: degeneração hepatocelular difusa acentuada (Pb2, HE, 40x). B) Rim: hemorragia subcapsular focalmente extensa moderada (*) (Pb3, HE, 10x). C) Baço: aumento no número de melanomacrófagos difuso moderado (Pb4, HE, 20x) D) Fígado: marcação positiva para cobre discreta (+) no interior de hepatócitos (setas). (Cu4, Rodanina, 20x).



Fonte: a própria autora.

As hemorragias renais observadas em todos os grupos intoxicados contrapõem ao visto na literatura, uma vez que as lesões mais recorrentes são principalmente: degeneração tubular, atrofia dos túbulos, agregados inflamatórios e por vezes necrose (KAUR et al., 2018).

Os órgãos com lesões histopatológicas mais representativas foram brânquias, fígado e rins. De forma geral, as alterações histopatológicas em todos os órgãos foram proporcionais a concentração dos metais. Gerando um padrão de lesão mais intenso nas concentrações maiores de cobre e chumbo, em brânquias, fígado e rins.

Ainda, através desse trabalho, foi possível realizar um método de eutanásia em peixes que não é usualmente aplicado, porém, que apresentou ótimos resultados quanto ao bem-estar animal no momento da eutanásia e aplicabilidade da técnica em pesquisas acadêmicas.

4. CONCLUSÃO

As intoxicações agudas por cobre e chumbo nas concentrações de 2, 3 e 4mg/L em carpas-capim alteram o metabolismo oxidativo, principalmente na dosagem de GST em brânquias. A intoxicação por chumbo está associada a redução no número de eritrócitos, e ainda, as lesões histopatológicas em brânquias, fígado e rins são as mais recorrentes, sendo degeneração hepática, branquite mista e hemorragia renal as mais frequentes.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

ADEYEMO, O. Haematological Profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to Lead. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 7. 163-169. 2007.

ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos Avançados**, v. 26, n. 74, p. 151–165, 2012.

ALIKO, V. et al. Drink and sleep like a fish: Goldfish as a behavior model to study pharmaceutical effects in freshwater ecosystems. **Journal of Biological Research (Italy)**, v. 92, n. 1, p. 1–4, 2019.

AL-JUBURY, A. et al. Stationary metal sheets (copper, zinc or brass) in fish tanks prevent *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 infection of rainbow trout: In vivo and in vitro effects. **Aquaculture**, v. 577, 15 dez. 2023.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Lead. 1999. Atlanta, Georgia.

ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Lead. 2007. Atlanta, Georgia.

BEUTLER, E. Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. 2. Ed. New York: Grune & Stratton, 1975. 160 p.

CATÃO-DIAS, J. L. DOENÇAS E SEUS IMPACTOSSOBRE A BIODIVERSIDADE. **BIODIVERSIDADE**, p. 32–34, 2003.

CONNELL, D.W.; MILLER, G.J. Some principles of pollution ecology and ecotoxicology. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*, New York, USA: John Wiley & Sons, 1984. p. 444.

CORDEIRO, R.; LIMA FILHO, E.C.; SALGADO, P.E.T. Reajustando o limite de tolerância biológica aplicado à plumbemia no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, p.2- 13, 1996.

DUTTA, B.; RANI SARMA, S.; DEKA, P. Lead nitrate toxicity on haematological changes in a live fish species *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 3, n. 2, p. 196–198, 2015.

EISLER, R., GARDNER, G. R. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper, and zinc salts. *Journal of Fish Biology*, West Kingston, USA: v. 5, n. 2, p. 131-142, 1973.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

ENEJI, I. S.; SHA'ATO, R. Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish (*Tilapia Zilli* and *Clarias Gariepinus*) Organs from River Benue, North-Central Nigeria. 2011.

EWING, M. S.; EWING, S. A.; ZIMMER, M. A. **Sublethal Copper Stress and Susceptibility of Channel Catfish to Experimental Infections with *Ichthyophthirius multifiliis*** *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* [s.l: s.n.].

FARMER, B. D. et al. Efficacy of Bath Treatments of Formalin and Copper Sulfate on Cultured White Bass, *Morone chrysops*, Concurrently Infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 2, p. 305–310, abr. 2013.

FIRJAN – FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO RIO DE JANEIRO. Guia para coleta seletiva de pilhas e baterias. FIRJAN: Rio de Janeiro; 2000.

FLORES-LOPES; THOMAZ, A. T. **Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring** *Braz. J. Biol.* [s.l: s.n.].

GABRIEL, F. et al. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. **PeerJ**, v. 8, 28 out. 2020.

GARCÍA-ORDIALES, E. et al. Heavy metal contamination in sediments of an artificial reservoir impacted by long-term mining activity in the Almadén mercury district (Spain). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6024–6038, 1 abr. 2016.

GFELLER, R.W.; MESSONNIER, S.P. Manual de Toxicologia e envenenamentos em pequenos animais. São Paulo: Ed. Roca, 2006. 376p.

GHAREEB, D. A. et al. Toxic effects of lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress, inflammation, acetylcholinesterase, and the beneficial role of flaxseed extract. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 187–195, jan. 2010.

GILL, T. S.; PANT, A. C. Erythrocytic and Leukocytic Responses to Cadmium Poisoning in a Freshwater Fish, *Puntius conchonus* Ham. **ENVIRONMENTAL RESEARCH**, v. 36, p. 327–337, 1985.

GUPTA, V. K. et al. Acetylcholinesterase from human erythrocytes as a surrogate biomarker of lead induced neurotoxicity. **Enzyme Research**, v. 2015, 2015.

IOANNIDES, K. et al. Distribution of heavy metals in sediment cores of Lake Pamvotis (Greece): a pollution and potential risk assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, p. 1–16, 20 nov. 2015.

JEZIERSKA, B.; WITESKA, M. THE METAL UPTAKE AND ACCUMULATION IN FISH LIVING IN POLLUTED WATERS. **Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation**, v. 69, p. 107–114, 2006.

JIANG, X. et al. Assessment of heavy metal accumulation in freshwater fish of Dongting Lake, China: Effects of feeding habits, habitat preferences and body size. **Journal of Environmental Sciences**, v. 112, p. 355–365, 1 fev. 2022.

KAUR, S. et al. Heavy metal induced histopathological alterations in liver, muscle and kidney of freshwater cyprinid, *Labeo rohita* (Hamilton). ~ **2137** ~ **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 2, 2018.

KEEN, J. H; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione s-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KOVACIK, A. **Oxidative Stress in Fish induced by Environmental Pollutants in Nitra-Slovenska posnohospodarska univerzita v Nitre** **Oxidative Stress in Fish**

induced by Environmental Pollutants **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/317184192>>.

LALL, S. P. The Minerals. In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. Fish Nutrition. 3 ed. Academic Press, p.260-301, 2002.

LE MOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição – causas, efeito e controle. Gen. Toxicol. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

LI, Q. et al. Sources and the distribution of heavy metals in the particle size of soil polluted by gold mining upstream of Miyun Reservoir, Beijing: implications for assessing the potential risks. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 10, p. 6605–6626, 1 out. 2014.

LIU, H. et al. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 3, p. 350–354, nov. 2006.

LOTZE, H. K. et al. Depletion degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. **Science**, v. 312, n. 5781, p. 1806–1809, 23 jun. 2006.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina PR: v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.

MALLATT, J. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, n. 4, p. 630–648, 1985.

MARQUES, J. J. et al. ELEMENTOS-TRAÇO EM SOLOS E SISTEMAS AQUÁTICOS Trace-elements effects on seed germination and seedlings physiology-phytoremediation prospects View project Recuperamina View project. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 345–390, 2005.

McCULLOCH, C.E.; SEARLE, S.R. Linear and generalized linear mixed models. New York: Wiley, 2000, 358p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022**. , 2022.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, A. K. **The Acute Toxic Effects of Copper on the Blood of a Teleost** **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY**. 1980.

MUNIZ, D. H. DE F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente Heavy metals of mining rejects and its effects on the health and the environment. n. 2, p. 83–100, 2006.

NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. **Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*** **Plant Science**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/plantsci>.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, n. 12, p. 134, 1988.

OLOJO, E. A. A. et al. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 117–122, 2005.

PAOLIELLO, M.M.B., CAPITANA, E.M. Chumbo. São Paulo; 2003. 353p. In: AZEVEDO, F.A., CHASISN, A.M. Metais: gerenciamento da toxicidade.

PARPART, A.K. ET AL. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *Journal of Clinical Investigations*, 26(4):636-640. 1947.

PATNAIK, B. B. et al. Histopathology of gill, liver, muscle and brain of *Cyprinus carpio communis* L. exposed to sublethal concentration of lead and cadmium. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 57, p. 12218–12223, 2011.

PERES, M. B.; VERCILLO, U. E.; DIAS, B. F. DE S. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, p. 45–48, 2011.

REDDY, G. R.; DEVI, B. C.; CHETTY, C. S. Developmental lead neurotoxicity: Alterations in brain cholinergic system. **NeuroToxicology**, v. 28, n. 2, p. 402–407, mar. 2007.

REGINA, M. et al. **REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE EFLUENTES INDUSTRIAIS POR ALUMINOSSILICATOS**Quim. Nova. [s.l: s.n.].

ROSENBERG, C. E. et al. RED BLOOD CELL OSMOTIC FRAGILITY IN *BUFO ARENARUM* EXPOSED TO LEAD. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 19–24, 1998.

SALOMONS, W. & FORSTNER, U. Interactions with ligands, particulate matter and organisms. *Metals in the hydrocycle*, Berlin, Germany: Springer Verlag, 1984. cap. 2, p. 5-62.

SHAHJAHAN, M. et al. Effects of heavy metals on fish physiology – A review. **Chemosphere**, v. 300, 1 ago. 2022.

SOUZA, A. K. R.; MORASSUTI, C. Y.; DEUS, W. B. DE. POLUIÇÃO DO AMBIENTE POR METAIS PESADOS E UTILIZAÇÃO DE VEGETAIS COMO BIOINDICADORES. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 9, n. 3, p. 95, 15 dez. 2018.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., PALERMO-NETO, J. Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária. São Paulo: Editora Manole. 2008. 942p

STRAUS, D. L. Prevention of ichthyophthirius multifiliis infestation in channel catfish fingerlings by copper sulfate treatment. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 152–154, 1993.

STRAUS, D. L.; HOSSAIN, M. M.; CLARK, T. G. Copper sulfate toxicity to two isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* relative to alkalinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 83, n. 1, p. 31–36, 28 jan. 2009.

SUKHOVSKAYA, I. V. et al. Role of glutathione in functioning of the system of antioxidant protection in fish (review). **Inland Water Biology**, v. 10, n. 1, p. 97–102, 1 jan. 2017.

SULA, E. et al. Digital light microscopy as a tool in toxicological evaluation of fish erythrocyte morphological abnormalities. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 4, p. 362–369, 1 abr. 2020.

TAO, Y. et al. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 55–64, 1 jul. 2012.

TORRES, A. M. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, São Paulo SP: v.71, p. 1-15, 2008.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13–30, 1 maio 2017.

VANZ, A; MIRLEAN, N; BAISCH, P. Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: Uma abordagem geoquímica. *Química Nova*. v.26, n.1, p.25-9. 2003.

VIARENGO, A., B. BURLANDO, e C. BOLOGNESIS. Cellular responses to copper in aquatic organisms. Pp. 417–431 in *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*, E. J. Massaro, ed. Totowa, NJ: Humana Press. 2002.

VUTUKURU, S. S. et al. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 221–229, out. 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. IPCS. Environmental Health criteria 165 – Inorganic Lead. Genova: WHO, 1995. 300 p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization.

ZHANG, L. et al. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in marine organisms in east and west Guangdong coastal regions, South China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 930–937, 30 dez. 2015.

ZHAO, Q. et al. Longitudinal distribution of heavy metals in sediments of a canyon reservoir in Southwest China due to dam construction. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 7, p. 6101–6110, jul. 2013.

ZULFAHMI, I. et al. Exposure to Lead Nitrate Alters Growth and Haematological Parameters of Milkfish (*Chanos chanos*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 5, p. 860–867, 1 nov. 2021.