UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CENTRO DE AQÜICULTURA DA UNESP CAMPUS DE JABOTICABAL

CONCENTRAÇÃO LETAL $CL_{50\text{-}96H}$ E EFEITOS SUB-LETAIS DO SELENITO DE SÓDIO (Na_2SeO_3) EM TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1757): ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Adriano Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Co-orientador: Prof. Dr. Júlio Vicente Lombardi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), como parte das exigências para a obtenção do Titulo de MESTRE em Aqüicultura, área de concentração em Aqüicultura de Águas Continentais.

Jaboticabal – SP

abril/2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CENTRO DE AQÜICULTURA DA UNESP CAMPUS DE JABOTICABAL

CONCENTRAÇÃO LETAL $CL_{50\text{-}96H}$ E EFEITOS SUB-LETAIS DO SELENITO DE SÓDIO (Na_2SeO_3) EM TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1757): ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Adriano Gonçalves

Jaboticabal – SP

abril/2004

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra,

a todos meus familiares

e à minha esposa

Denise

TODOS TÊM DIREITO A UM AMBIENTE ECOLOGICAMENTE EQUILIBRADO, BEM DE USO COMUM DO POVO E ESSENCIAL À SADIA QUALIDADE DE VIDA, IMPONDO-SE AO PODER PÚBLICO E À COLETIVIDADE O DEFENDÊ-LO E PRESERVÁ-LO PARA AS PRESENTES E FUTURAS GERAÇÕES

Constituição Brasileira de 1988, artigo 225

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente a professora, pesquisadora e orientadora Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva e ao professor, pesquisador e co-orientador Dr. Júlio Vicente Lombardi, pelo carinho e ensinamentos prestados, sendo estes de grande valor.

- Aos Professores e Pesquisadores da banca, Dr. Flávio Ruas de Morais e Dr. José Roberto Ferreira.

- Ao amigo Fernando Maiorino pelo apoio na leitura das lâminas histológicas.

- À amiga Veralice pelo carinho e atenção prestados durante o decorrer destes anos no CAUNESP.

- Ao Instituto de Pesca de São Paulo, por tornar possível a realização desta obra.

- Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade de realização do curso.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo concedida, e pelo Auxílio creditado no Projeto 00/14460-3.

- As pisciculturas Aquabel e Águas claras pelo fornecimento dos peixes.

- Aos pesquisadores e funcionários do Instituto de Pesca de São Paulo, pela amizade e convívio.

- Aos pesquisadores Carlos Ishikawa e Cláudia Maris, pela amizade e apoio prestado.

- Ao pesquisador e amigo Paulo Sérgio Ceccarelli, pelo apoio e incentivo a realização do mestrado.

- Aos estagiários do Instituto de Pesca de São Paulo: Robson, Nardo, Dani, Fernanda, Patrícia e Silmara, pela grande ajuda prestada para a realização deste trabalho.

- Ao Luis, técnico de laboratório do Instituto de Pesca de São Paulo, pelas análises de água realizadas.

- A todos os pesquisadores e amigos do CAUNESP, pela convivência e pelos grandes momentos juntos.

- A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo Geral.....1
Abstract.....3
Introdução Geral.....5
Objetivo Geral.....11
Referências.....12

CAPÍTULO 1

Toxicidade aguda do selenito de sódio para tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) 15
Resumo.....15
Abstract.....16
Introdução.....17
Material e métodos.....19
Resultados e discusão.....22
Conclusões.....26
Referências.....27

CAPÍTULO 2

Alterações hematológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus*,(Linnaeus, 1757) exposta a concentrações sub-letais do selenito de sódio......29
Resumo.....29
Abstract.....31
Introdução.....32
Material e métodos.....34
Resultados e discussão.....38
Conclusões.....49
Referências.....50

CAPÍTULO 3

Alterações histopatológicas em tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) exposta as concentrações sub-letais do selênio......54
Resumo.....54
Abstract.....55
Introdução.....56
Material e métodos.....57
Resultados e discussão.....59
Conclusões.....65
Referências.....66

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1.....15

Tabela 1 – Média das variáveis físicas e químicas da água do teste de toxicidade aguda de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus* 22

Tabela 2 - Mortalidade cumulativa (%) de *Oreochromis niloticus*, em função do tempo, no teste de toxicidade aguda com selenito de sódio.....23

Tabela 3 - Valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para diferentes espécies de peixes expostos ao selênio.....25

CAPÍTULO 2.....29

Tabela 1 – Média das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus*.....38

CAPÍTULO 3.....54

Tabela 1 - Média das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus*.....59

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.....15

Figura 1 - Alevino de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizado no experimento de toxicidade aguda do selenito de sódio.....19

Figura 2 -(a) Vista da bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade aguda, (b) sistema de aeração utilizado durante o experimento de toxicidade aguda do selenito de sódio.....20

CAPÍTULO 2.....29

Figura 1 - Juvenil de tilápia, *Oreochromis niloticus* utilizado no teste de toxicidade crônica com selenito de sódio.....34

Figura 2 - Bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade crônica do selenito de sódio realizado com tilápia, *Oreochromis niloticus*.....35

Figura 3 - Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos de tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta.....41

Figura 4 - Valores médios do número total de trombócitos em tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta.....43

Figura 5 - Células sangüíneas observadas em tilápia, *O. niloticus*, Rosenfeld. 1000 x 44

Figura 6 - Valores médios dos números absolutos de leucócitos totais e contagem diferencial, em sangue periférico de tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta.....46

CAPÍTULO 3.....54

Figura 1 -. Fotomicrografia de brânquia (a) e rim mesonefro (b) de tilápia, *O. niloticus*, revelando estrutura histológica normal do momento zero e do grupo controle, coradas com H.E.....61

Figura 2 - Fotomicrografia de brânquia de tilápia, *O. niloticus* exposta a concentração de 0,4 $mgSe^{4+}/L$, coletada no décimo dia, revelando hiperplasia epiltelial (seta), coradas com H.E.....61

Figura 3 - Fotomicrografia de rim (mesonefro) de tilápia, *O. niloticus* exposta à concentração de 0,04 e 0,4 $mgSe^{4+}/L$, coletada no sétimo dia, revelando infiltrado mononuclear no interstício (i.m) e nefrose (n). Coradas com H.E.....62

Figura 4 - Fotomicrografia de rim (mesonefro) de tilápia, *O. niloticus* exposta à concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L, coletada no décimo quarto dia, revelando nefroesclerose (n.e). Coradas com H.E.....62

Figura 5 - Fotomicrografia de rim (mesonefro) de tilápia, *O. niloticus*, exposta à concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L, coletada no décimo quarto dia, revelando edema (e), hemorragia (h) e calcificação tubular (c.t). Coradas com H.E.....63

Figura 6 - Fotomicrografia de rim (mesonefro) de tilápia, *O. niloticus*, exposta à concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L, coletada no décimo dia, revelando glomérulonefrite proliferativa (g.n.p), atrofia glomerular (a.g), glomérulo esclerose (g.e) e degeneração vacuolar tubular (d.v). Coradas com H.E.....63

APÊNDICES

CAPÍTULO 2.....29

Apêndice 1 - Média das contagens globais e diferenciais de leucócitos de tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2004.....69

Apêndice 2 - Média das análises sangüíneas da série vermelha de tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2004.....70

Resumo Geral

Neste trabalho foi empregado o bioensaio em fluxo semi-estático, utilizando tilápia, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1757) para avaliar a toxicidade aguda e crônica do selenito de sódio. Para a determinação da concentração letal média (CL_{50}), utilizou-se o teste de toxicidade aguda com alevinos submetidos a diferentes concentrações de selenito de sódio na água. Para o teste de toxicidade crônica, foram empregadas quatro condições, sendo uma controle, duas concentrações estimadas a partir das frações CL_{50} / 10 (0,4 $mgSe^{4+}/L$) e CL_{50} /100 (0,04 $mgSe^{4+}/L$) e a última divulgada pela resolução do CONAMA (1986) (0,01 $mgSe^{4+}/L$). O experimento foi conduzido por 14 dias, com amostragem de dois indivíduos por tratamento antes e após o terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dia para a avaliação dos efeitos crônicos sub-letais, através das análises hematológicas e histopatológicas. Os parâmetros hematológicos analisados foram: número de eritrócitos (Er), taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), número de trombócitos (Tr), número total e diferencial de leucócitos e cálculo dos índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Foram coletados fragmentos de brânquias, fígado e rim, fixados em formol 10%, por 24 horas à temperatura ambiente, posteriormente transferido para solução de álcool 70%, armazenados em frascos e depois processados para inclusão em parafina. Os cortes de 6 μm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina. Com os dados obtidos, foi possível determinar a concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$) para selenito de sódio de 4,29 $mgSe^{4+}/L$, para alevinos de tilápia. Para as análises hematológicas verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para alguns parâmetros: volume

corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) e taxa de hemoglobina (Hb), na concentração de 0,4 $mgSe^{4+}/L$ no, terceiro dia de coleta. O mesmo foi observado em 0,04 $mgSe^{4+}/L$ para CHCM. No décimo dia de coleta apenas CHCM, na concentração de 0,04 $mgSe^{4+}/L$, diferiu estatisticamente dos demais ($p<0,05$). Nas concentrações de 0,01 e 0,4 $mgSe^{4+}/L$ ocorreu diferença estatística para CHCM no décimo quarto dia de coleta para VCM na concentração de 0,04 $mgSe^{4+}/L$. Os valores médios do número de linfócitos na concentração de 0,01 $mgSe^{4+}/L$, no terceiro dia de coleta, mostraram-se estatisticamente diferentes ($p<0.05$). As alterações histopatológicas observadas nas brânquias foram edema e hiperplasia. Os rins apresentaram, degeneração vacuolar tubular, glomérulonefrite, nefroesclerose, calcificação tubular, edema e hemorragia.

Abstract

This work was a bioassay with tilapia, *Oreochromis niloticus*, performed in order to evaluate acute and chronic toxicity caused by sodium selenite. In order to determine Mean Lethal (CL_{50}) concentration, acute toxicity test was used in juveniles submitted to different concentrations of selenito in the water. In the chronic toxicity test, four conditions were tested: a control one, two concentrations estimated from fractions CL_{50} / 10 (0.4 $mgSe^{4+}/L$) and CL_{50} /100 (0.04 $mgSe^{4+}/L$), and a last one, reported by CONAMA resolution (1986) (0.01 $mgSe^{4+}/L$). The trial lasted 14 days, and sampling consisted of two individuals per treatment collected in the following intervals: 0, 3, 7, 10 and 14 days, in the evaluation of sublethal chronic effects. Samples were submitted to hematological and histopathological analyses. Hematological parameters analyzed were: erythrocyte count (Er), hemoglobin level (Hb), hematocrit (Ht), thrombocyte count (Tr), total and differential leukocyte count and calculation of absolute hematimetric indices: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Fragments of branchia, liver and kidneys were collected and fixed and formaldehyde 10% for 24 hours at room temperature. They were then transferred to alcohol 70% and placed in jars to be later on included in paraffin. Six-µm thick sections were produced and stained using hematoxilin-eosin. According to the results obtained, it was possible to determine mean lethal concentration (CL_{50}) for sodium selenite as equal to 4.29 $mgSe^{4+}/L$, for tilapia juveniles. Hematological analyses showed that significant differences ($p<0.05$) could be observed in the following parameters: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and hemoglobin concentration (Hb), when selenite concentration was equal to 0.4 $mgSe^{4+}/L$, on the third day of sample collection. The same was observed for 0.04 $mgSe^{4+}/L$, in relation to MCHC. On

the tenth day of sample collection, only MCHC, at 0.04 mgSe^{4+}/L, was statistically different ($p<0.05$) from the other samples. In concentrations equal to 0.01 and 0.4 mgSe^{4+}/L, statistical differences ($p<0.05$) were observed in MCHC on the fourteenth day of sample collection, and for MCV, in 0.04 mgSe^{4+}/L. Mean counts of lymphocytes at 0.01 mgSe^{4+}/L, on the third day of sample collection, were statistically different ($p<0.05$). Histopathological alterations observed in branchia were edema and hyperplasia. Kidneys presented vacuolar tubular degeneration, glomerulonephritis, nephrosis, nephrosclerosis, tubular calcification, edema and hemorrhage.

Introdução Geral

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, está amplamente distribuída geograficamente e é de fácil adaptação climática. A alta qualidade de sua carne faz dela um produto de interesse industrial de boa aceitação pelo mercado consumidor, sendo intensamente cultivada na piscicultura mundial e uma das espécies mais indicadas nas regiões tropicais (CASTAGNOLLI, 1992). OSTRENSKY *et al.* (2000), comentam que, no Brasil, 47,3% da produção de tilápia é obtida pelo cultivo.

Segundo VALENTI *et al*. (2000), a aqüicultura brasileira pode ser considerada como importante atividade econômica, gerando ganhos significativos para a economia regional e nacional. De acordo com esse mesmo autor, todas as atividades aqüícolas são dependentes dos ecossistemas nos quais está inserida, e estes devem permanecer em equilíbrio para possibilitar a manutenção desta atividade.

O sucesso da piscicultura está associado ao ambiente favorável livre de fatores nocivos que possam acarretar danos aos animais comprometendo a produção. Os fatores que podem prejudicar a piscicultura são cada vez mais alvo de estudos, com a finalidade de se obter maior conhecimento para esta atividade.

Os agentes tóxicos entram nos ecossistemas aquáticos pela contaminação por efluentes domésticos, industriais e agrícolas que, por vezes chega à contaminação da água do lençol freático. Segundo este autor, a toxicidade é uma propriedade relativa de determinada substância química, e se refere ao seu potencial de causar efeito danoso a uma população de seres vivos. Ela é função da concentração da substância química e do tempo de

exposição a ela. A ação antropogênica representa a principal fonte de elementos tóxicos no ambiente (DAMATO, 2000).

O selênio, na natureza, é liberado na água pela dissolução ou oxidação de rochas e sais solúveis (DÍAZ *et al*., 1996).

Nas indústrias, o selênio é utilizado na fabricação de vidros e pigmentos para pinturas, tinturarias, células fotoelétricas, componentes de retificadores, semi-condutores, medicamentos e inseticidas. Estima-se que efluentes industriais atuam no aumento da concentração de selênio, em rios e lagos em cerca de 90ng/L por ano (NRIAGU e PACYNA, 1998).

Segundo WATANABE e SATOH (1997), os minerais são essenciais para os processos vitais e os peixes os retiram da água para sua alimentação para manter as atividades metabólicas das células e tecidos. O selênio em baixos níveis é benéfico para as funções metabólicas, como a síntese da glutationa peroxidase (GUNBY, 1981), e atua como antioxidante intracelular, na prevenção da peroxidação de lipídios das membranas celulares dos eritrócitos e de outras células contra os danos provocados pelos radicais livres (STADTMAN, 1980). Nos peixes, grande parte do selênio é absorvida pela membrana branquial e pelo intestino, depois é estocado nos tecidos, principalmente no fígado, sob a forma inorgânica (WATANABE e SATOH, 1997; LOW e SIN, 1998).

O nível mínimo requerido de selênio para dieta dos peixes se encontra entre 0,2 e 0,5 mg/kg (STEFFENS, 1989). O selênio desempenha importante papel nos sistemas biológicos, sendo que seu caráter tóxico depende da concentração, absorção e bioviabilidade (DÍAZ *et al.*, 1996).

Segundo GATLIN e WILSON (1984), a contaminação dos ecossistemas aquáticos por selênio causa efeitos nocivos em peixes tais como redução do crescimento e mortalidade.

Geralmente o selênio é considerado um dos mais tóxicos dos elementos minerais para os peixes, quando em altas concentrações. A mortalidade induzida pelo selênio varia com a espécie, temperatura, presença de parasitos, idade, fonte de contaminação, concentração, tempo de exposição, forma química e outros fatores (SORENSEN, 1991).

A manifestação primária da toxicidade do selênio é a falha no processo de síntese protéica. Quando em excesso, o selênio substitui erroneamente o enxofre, resultando na formação de compostos que impedem a formação de ligações químicas importantes. O resultado disso são enzimas e moléculas protéicas distorcidas e disfuncionais, que impedem processos bioquímicos normais das células. A substituição do enxofre pelo selênio prejudica a formação de proteínas tanto em peixes juvenis como em adultos, sendo que muitos órgãos e tecidos internos desenvolvem processos patológicos crônicos, assintomáticos (LEMLY,2002).

Um dos efeitos do excesso de selênio é a teratogênese. O selênio consumido na dieta de peixes adultos é depositado nos ovos e metabolizado pela larva após eclosão. Uma variedade de deformidades letais e sub-letais ocorre nos peixes em desenvolvimento, afetando todos os tecidos. A conseqüência é a redução das populações, que podem eventualmente desaparecer, ocorrendo, colapso na exploração deste recurso (LEMLY, 2002). Esse efeito teratogênico do selênio foi também observado por SWEE *et al.* (2002),

em embriões de *Pogonichthys macrolepidotus* expostos a diferentes concentrações de selenito de sódio, por período de 48 horas.

Desequilíbrios ambientais quanto a concentrações de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, sólidos dissolvidos, dureza, alcalinidade e condutividade da água e fatores fisiológicos, como estado nutricional dos animais associados à biodisponibilidade de agentes químicos em meios aquáticos, podem levar à variação da sensibilidade individual e influenciar na susceptibilidade de substâncias tóxicas (DAMATO, 2000).

Como a aqüicultura depende dos recursos hídricos, sendo que grande parte das criações de peixes realiza-se em tanques-rede, tanques e viveiros, e estes são dependentes de rios e lagos, conseqüentemente águas com quantidades tóxicas de qualquer agente, inclusive de selênio, são uma ameaça para a aqüicultura.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos realizados em laboratório permite a avaliação dos efeitos de agentes tóxicos que podem provocar alterações na qualidade da água e prejudicar a biota ali existente. Os organismos representativos do ambiente são utilizados como organismos teste, sendo submetidos a diferentes concentrações do agente tóxico, por um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). De acordo com SOARES (1991), os testes de toxicidade servem de base para a política adequada de gestão dos recursos ambientais, constituindo um instrumento fundamental na preservação do ambiente.

Para se avaliar as alterações provocadas nos peixes pela contaminação ambiental são freqüentemente realizados estudos com sangue e órgãos dos animais expostos aos contaminantes em doses sub-letais.

Vários autores enfatizam que o conhecimento das anormalidades existentes no sangue constitui meio auxiliar valioso e seguro na avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos peixes (KAVAMOTO *et al*., 1983; RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985; RIBEIRO *et al*., 1999).

Segundo OLIVEIRA-RIBEIRO *et al*. (2000), estudos de toxicidade utilizando peixes em condições controladas de laboratório, permitem, através das alterações hematológicas e danos nos tecidos, obter informações importantes correspondentes aos efeitos causados na biota de determinado ecossistema, em ambiente natural.

SORENSEN e BAUER (1984) e SORENSEN *et al.* (1984), notaram redução do hematócrito e da taxa de hemoglobina e aumento do número de leucócitos circulantes com aumento do número de linfócitos, em *Lepomis cyanellus* exposto a altas concentrações de selênio.

DEAKER e MAHER (1997) e PETERS *et al*. (1999), observaram efeitos sub-letais em peixes expostos a alta concentração de selênio, relatando alterações histológicas como edemas, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aberrações cromossômicas e complicações no miocárdio e pericárdio. SORENSEM *et al.* (1983), relataram necroses hepáticas e glomerulonefrite em *Lepomis microlophus* expostos ao selênio.

LOW e SIN (1998), observaram inibição da atividade de lisoenzima renal e a proliferação de linfócitos em *Trichogaster trichopterus*. MORA *et al*. (2001) verificaram que tilápia exposta ao selênio apresenta sinais de estresse e diminuição na quantidade de alimento ingerido.

FAN *et al*. (2002), referem-se a alterações histopatológicas no fígado (agregado de macrófagos e presença de linfócitos perivascular) e ovário (atresia folicular e inflamação) de carpas expostas ao selênio, coletadas em locais de escoamento de resíduos agrícolas.

Como visto, os peixes são vulneráveis aos agentes químicos e podem assim exercer função de bio-indicadores de áreas possivelmente contaminadas com selênio de origem natural ou artificial.

Assim, os estudos das relações dos componentes bióticos e abióticos do ecossistema, são importante ferramenta para assegurar a qualidade do meio ambiente, da produção aqüícola e, principalmente, da saúde pública.

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração letal média (CL_{50}) de selênio na forma de selenito de sódio (Na_2SeO_3) para a tilápia, *Oreochromis niloticus*, pelo teste de toxicidade aguda; analisar os efeitos de concentrações sub-letais em teste de toxicidade crônica, através de análises hematológicas e histopatológicas; comparar os resultados obtidos no presente estudo com a resolução divulgada pela Legislação Ambiental vigente (CONAMA, 1986) quanto aos níveis aceitáveis de selênio para preservação de organismos aquáticos, destinados ao consumo humano.

Referências Bibliográficas

CASTAGNOLLI, N. 1992. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Funep. 189p.

CONAMA. 1986. Resolução Nº 20, de 18 de junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo 30/07/86: p. 11 – 356.

DAMATO, M. 2000. Workshop sobre Qualidade da Água na Aqüicultura. Anais-Pirassunga: CEPTA, 92 p.

DEAKER, M. e MAHER, W. 1997. Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. Analytica Chimica Acta, 350: 287-294.

DÍAZ, J.P.; NAVARRO, M.; LÓPEZ, H. e LÓPEZ, M.C. 1996. Selenium (IV) and (VI) levels in potable, irrigation and waste waters from an industrial zone in southeastern Spain. The Science of the Total Environment, 186: 231-236.

FAN, T. W. M.; TEH, S. J. HINTON, D. E. e HIGASHI, R. M. 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium ladem drainage waters in California. Aquatic Toxicology, 57: 65-84.

GATLIN, D.M. e WILSON, R.P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. Journal of Nutrition, 114: 627-633.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E. e ZAGATTO, P. A. 1990. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETEB, 17p.

GUNBY, P. 1981. Selenium may act as cancer inhibitor. Journal of the American Medicine Association, 246: 1510.

KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estádio de desenvolvimento gonadal maduro. Boletim do Instituto de Pesca, 10 (único): 53 – 60.

LEMLY, A. D. 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the belews lake case example. Aquatic Toxicology, 57: 39-49.

LOW, K.W. e SIN, Y.M. 1998. Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). The Science of the Total Environment, 214: 153 – 164.

MORA, M.A.; PAPOULIAS, D.; NAVA, I. e BUCKLER, D.R. 2001. A comparative assessment of contaminants in fish from four resacas of the Texas, USA-Tamaulipas, Mexico border region. Enviroment International, 27: 15-20.

NRIAGU, J.O. e PACYNA, J.M. 1998. Quantitative assessment of worlwide contamination of air, water and soil by trace metals. Nature, 333: 134 – 139.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C e ROULEAU, C. 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. Environmental Research Section A, 83: 286-292.

OSTRENSKY, A.; BORGHETT, J.R. e PEDINI, M. 2000. Situação atual da Aquicultura Brasileira e Mundial. P. 354-81. In VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura no Brasil – bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/ Ministério de Ciência e Tecnologia. 399p.

PETERS, G.M.; MAHER, W.A.; KRIKOWA, F.; ROACH, A.C.; JESWANI, H.K.; BARFORD, J.P.; GOMES, V.G. e REIBLE, D.D. 1999. Selenium in sediments, pore waters and benthic infauna of Lake Macquarie, New south Wales, Australia. Marine Environmental Research, 47: 491-508.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1985. Estudos hematológicos em Curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (OSTEICHTHYES, CYPRINIFORMES, PROCHILODONTIDAE). Série vermelha. Boletim do Instituto de Pesca. 12 (2): 25 – 35.

RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. e TJALVE, H. 1999. Distribuition kinetics of dietary methylmercury in the Artic Charr (*Salvelinus alpinus*). Environmental of Science Technology, 33: 902 – 907.

SOARES, A. M. V. M. 1991. Ecotoxicologia e determinação de riscos ecológicos. Prática e Perspectivas. In: Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Lisboa. Anais/Lisboa. 1: 43-52.

SORENSEN, E. M. B. 1991. Metal poisoning in fish. Florida: CRC Press. 597p.

SORENSEN, E. M. B. e BAUER, T. L. 1984. A correlation between selenium accumulation in sunfish and changes in condition factor and organ weight. Environmental. Pollutant, 34: 357-366.

SORENSEN, E. M. B.; BELL, J. S. e HARLAN, C.W. 1983. Histopathological changes in selenium exposed fish. American Journal Forensic Medicine Pathology, 4(2): 111-123.

SORENSEN, E.M.B.; CUMBIE, P.M.; BAUER, T.L.; BELL, J.S. e HARLAN, C.W. 1984. Histopathological, hematological, condition-factor, and organ weight changes associated with selenium accumulation in fish from Belews Lake, North Carolina. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 13: 153-162.

STADTMAN, T. C. 1980. Selenium dependent enzymes. Ann Ver Biochemistry, 49: 93 p.

STEFFENS, W. 1989. Principles of fish nutrition. New York: Ellis Horwood, 384.

SWEE, J. T.; XIN, D.; FOO-CHING, T. e SILAS, O. H. 2002. Selenium-induced teratogenicity in sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). Marine Environmental Research, 54: 605-608.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A. e BORGHETTI, J.R. 2000. Aquicultura no Brasil bases para um desenvolvimento sustentável. CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. 399 p.

WATANABE, T. e SATOH, V.K.S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture 151: 185-207.

Capitulo 1

Toxicidade Aguda do Selenito de Sódio para Tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi o de determinar a concentração letal média (CL_{50}) selenito de sódio, pelo teste de toxicidade aguda em tilápia, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus,1757). O teste foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca, em São Paulo - SP, em ambiente climatizado. Foram utilizados alevinos com peso médio de 0,41 ± 0,12 g e comprimento médio de 2,46 ± 0,21 cm. Os peixes foram mantidos em aquários contendo 5 litros de água e as concentrações de selênio correspondente à concentração desejada. Os aquários foram dispostos em três réplicas, conduzidas simultaneamente, contendo cinco concentrações tóxicas de: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 $mgSe^{4+}/L$ e mais um grupo controle, totalizando 18 aquários, com 10 indivíduos, por aquário. O experimento foi conduzido por um período de 96 horas e a ocorrência de mortalidade, registrada a cada 24 horas. O sistema escolhido foi o semi-estático. Com os dados obtidos, foi possível determinar a concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$) para selenito de sódio de 4,29 $mgSe^{4+}/L$ para alevinos de tilápia.

Abstract

The aim of this assay was to determine the selenium mean lethal concentration (CL_{50}), as sodium selenite, by means of an acute toxicity text in tilapia, *Oreochromis niloticus*. The test was conducted in the laboratory of aquatic organism pathology at the Instituto de Pesca, São Paulo – SP. The trial was conducted in an acclimatized environment. Animals used were tilapia juveniles with mean weight equal to 0.41 ± 0.12 g, and mean length equal to 2.46 ± 0.21 cm. Fish were kept in aquaria containing five liters of water and different selenite concentrations. Three replicates of the aquaria were simultaneously analyzed, in five different concentrations: 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 16.0 $mgSe^{4+}/L$, besides a control group, in a total of 18 aquaria, with 10 individuals each. The trial was conducted for 96 hours and the occurrence of deaths was recorded every 24 hours. A semi-static system was chosen. Based on the results, it was possible to determine mean lethal concentration (CL_{50}) for sodium selenite as 4.29 $mgSe^{4+}/L$ for tilapia juveniles.

Introdução

A piscicultura tem como objetivo a criação de peixes, para o abastecimento destes no mercado consumidor. Segundo os dados de OSTRENSKY *et al*. (2000), a produção aqüícola mundial cresceu entre 1997 e 1998 cerca de 6,2 %. A tilápia, *Oreochromis niloticus*, é bastante cultivada no Brasil, por apresentar um bom valor econômico (CASTAGNOLLI, 2000).

Para o sucesso da aqüicultura é necessário ambiente favorável e neste contexto, a qualidade da água assume papel de extrema importância. Segundo SIPAÚBA-TAVARES (1995), a introdução de qualquer substância na água acarreta alterações na sua qualidade, nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos organismos aquáticos.

A presença do selênio na água resulta de efluentes industriais e agrícolas (SWEE *et al.* 2002). As indústrias utilizam o selênio para fabricação de pigmentos para pinturas, tinturarias, fabricação de vidros, células fotoelétricas, componentes de retificadores, semi-condutores, medicamentos e inseticidas (GERMAN, 1992). Como a aqüicultura depende de recursos hídricos, oriundos de lençóis freáticos, rios e lagos, a presença de quantidades tóxica de selênio é uma ameaça.

Nos testes de toxicidade aguda são utilizadas diferentes concentrações de dada substância, dentro de condições pré-estabelecidas. O efeito observado ao final de 96 horas de exposição é a imobilidade ou a mortalidade dos organismos. Com os dados de mortalidade obtidos, determina-se a CL_{50} (concentração letal média), isto é, a concentração que causa mortalidade em 50% dos organismos em 96 horas (CETESB, 1999).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$) do selênio, na forma de selenito de sódio, pelo teste de toxicidade aguda, em alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca, em São Paulo - SP, em ambiente climatizado (temperatura constante de 26,0 ± 0,79 ^{0}C). Os peixes utilizados foram alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de 0,41 ± 0,12 g e comprimento médio de 2,46 ± 0,21 cm (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Alevino de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizado no experimento de toxicidade aguda do selenito de sódio

O processo de aclimatação iniciou-se com o acondicionamento dos peixes em aquários de 60 litros, estocados de acordo com as densidades dos testes de toxicidade (0,8 g peixe/L), pelo período de 96 horas. Durante este período, os animais ficaram em observação para se determinar possíveis doenças, presença de parasitos ou danos físicos. Em seguida, foram aclimatados por mais 48 horas em outros aquários, sob as mesmas condições de laboratório onde seriam conduzidos os testes. A alimentação foi fornecida em forma de ração farelada, com 38% de proteína bruta.

Durante os testes de toxicidade aguda os alevinos foram acondicionados em aquários de cinco litros de água (10 alevinos/aquário), dotados de aeração artificial e revestidos internamente com sacos plásticos transparentes e permaneceram em jejum (FIGURA 2). O sistema utilizado foi o semi-estático, onde 1/3 da água era substituída a cada 24 horas. O experimento foi conduzido pelo período de 96 horas (APHA *et al.*, 1989).

FIGURA 2 - (a) Vista da bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade aguda, (b) sistema de aeração utilizado durante o experimento de toxicidade aguda do selenito de sódio

A substância teste foi o selenito de sódio (Na_2SeO_3), do laboratório Synth®. O produto em forma de sal foi diluído na proporção de 1,666 g em 500 mL de água MILLI – Q. Este procedimento resultou em solução concentrada do produto químico, de 1.000,00 $mgSe^{4+}/L$, denominada de solução estoque. Esta solução foi pipetada e diluída diretamente nos aquários, em quantidade suficiente para proporcionar as cinco concentrações testadas: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 $mgSe^{4+}/L$ e mais grupo controle. As variáveis físicas e químicas da água como temperatura (^oC), condutividade elétrica (μScm^{-1}), pH e oxigênio dissolvido (mg /L), foram monitoradas após duas horas do início do teste e, posteriormente, a cada 24 horas. Ao final de 96 horas foram coletadas amostras de água dos aquários e realizadas as

análises de dureza total, pelo método de títulometria e do teor de amônia total (mg /L), por colorimetria.

Nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram registradas as mortalidades, sendo os indivíduos mortos retirados dos aquários. A $CL_{50–96h}$ foi determinada pelo método estatístico Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al*., 1977).

A água utilizada nos testes com selenito de sódio foi armazenada em galões e encaminhada ao (CENA) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, para tratamento de resíduos químicos.

Resultados e Discussão

Não foram observadas alterações nas variáveis físicas e químicas da água utilizada no teste de toxicidade aguda com alevinos de tilápia (TABELA 1) que pudessem interferir no resultado de CL_{50} obtido, estando todos eles dentro dos níveis considerados ideais para o cultivo de peixes (BOYD, 1982). Os altos valores de NH_4 se referem à amônia total, no entanto, a amônia em sua forma tóxica se manteve de acordo com os cálculos realizados por NOGA (1995), com média de 0,22 mg/L, ficando assim, abaixo dos níveis de toxicidade para peixes que é entre 0,6 a 2,0 mgNH_3/L. A variação da condutividade elétrica ocorreu proporcionalmente a cada concentração, devido ao selênio ter sido utilizado na forma de sal, elevando assim a condutividade elétrica da água onde a concentração do sal era maior.

TABELA 1 – Média das variáveis físicas e químicas da água do teste de toxicidade aguda de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus*

Concentrações ($mgSe^{4+}$/L)	**Controle**	**1,0**	**4,0**	**16,0**
Temperatura (^{0}C)	25,99 ± 0,09	25,97 ± 0,06	25,93 ± 0,17	25,57 ± 0,14
(Ax)	25,3 – 26,4	25,4 – 26,6	24,4 – 26,6	25,3 – 26,1
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,33 ± 0,16	6,50 ± 0,22	6,43 ± 0,09	6,58 ± 0,12
(Ax)	5,9 – 6,68	6,2 – 7,4	5,8 – 6,8	5,9 – 7,1
pH	7,42 ± 0,03	7,49 ± 0,02	7,58 ± 0,03	7,77 ± 0,10
(Ax)	7,25 – 7,56	7,31 – 7,66	7,46 – 7,79	7,66 – 7,89
Condutividade(µS/cm)	65,85 ± 2,54	68,56 ± 1,19	79,93 ± 0,86	103,57 ± 3,52
(Ax)	59,3 – 78,9	59,5 – 87,0	70,1 – 100,4	89,9 – 127,7
Amônia Total (mg NH_4/L)	2,14 ± 1,34	1,66 ± 0,61	2,18 ± 0,26	2,14 ± 0,20
(Ax)	0,85 – 1,98	0,82 – 2,24	1,88 – 2,36	1,91 – 2,21
Dureza (mg $CaCO_3$/L)	22,21 ± 0,92	22,87 ± 0,92	24,17 ± 2,26	22,21 ± 1,13
(Ax)	21,56 – 23,52	21,56 – 23,52	21,56 – 25,48	21,56 – 23,52

Ax = amplitude de variação da variável x

Os resultados de mortalidade das tilápias expostas a diferentes concentrações de selênio, por 96 horas, são apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 - Mortalidade cumulativa (%) de *Oreochromis niloticus*, em função do tempo, no teste de toxicidade aguda com selenito de sódio

Tratamentos ($mgSe^{4+}/L$)	**Mortalidade acumulativa (%) Tempo (horas)**												
	24			**48**			**72**			**96**			
Repetições	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**Média**
controle	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	3,3
1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	10	13,3
2,0	0	0	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	6,6
4,0	0	0	0	10	0	0	30	20	0	60	40	40	46,6
8,0	0	0	0	80	30	0	90	80	50	90	90	70	83,3
16,0	50	50	70	70	90	90	100	100	100	100	100	100	100

No grupo controle, ocorreu nas primeiras 24 horas, apenas em uma das réplicas, 10% de mortalidade e 0% nos demais tempos. Este é o limite máximo de taxa de mortalidade no grupo controle aceito neste tipo de experimento (APHA *et al.*, 1999).

GAIKWAD (1989), observou aumento dos batimentos branquiais em *Etroplus maculatus*, submetidos a teste de toxicidade aguda com selênio. Esse mesmo sinal clínico foi observado no presente trabalho nas primeiras horas de exposição, ocorrendo principalmente na maior concentração (16,0 $mgSe^{4+}/L$), em que os animais apresentaram também hiperatividade, escurecimento da pele (melanose), dispnéia e morte.

A porcentagem de mortalidade de alevinos aumentou proporcionalmente das concentrações do selênio na água. Na concentração de 16,0 mgSe^{4+}/L, observou-se 100% de mortalidade, em 72 horas. Em 8,0 mgSe^{4+}/L, a mortalidade foi de 83%, em 96 horas. Nas concentrações mais baixas 1,0 e 2,0 mgSe^{4+}/L o índice de mortalidade se manteve relativamente baixo. Apenas na concentração de 4,0 mgSe^{4+}/L observou-se 50% de mortalidade, em 96 horas.

Com os dados obtidos no período de 96 horas, foi possível determinar, o valor da concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$) de selenito de sódio que foi de 4,29 mgSe^{4+}/L, para alevinos de tilápia. Este valor encontra-se dentro da faixa de 1 a 35 mgSe^{4+}/L determinada por NIIMI e LAHAM (1976) e SATO *et al.* (1983), e ao de 4,8 mgSe^{4+}/L encontrado por KLAVERKAMP *et al.* (1983), para *Perca flavescens*.

Por outro lado, os valores de $CL_{50\text{-}96h}$ de selenito de sódio calculados para alevinos de tilápia do presente trabalho foram menores, ou seja, mais tóxicos do que os mencionados para *Pargus major* (11,5 mgSe^{4+}/L) por TAKAYANAGI (2001). O valor superior encontrado por este último autor pode estar relacionado com a maior dureza da água em seu experimento (380 mg $CaCO_3$/L), comparada com a média (22,86 mg $CaCO_3$/L) do presente trabalho.

CARDWELL *et al.* (1976) determinaram a CL_{50} de 2,9 mgSe/L para *Pimefales promelares*, utilizando dióxido de selênio, cujo valor é inferior àquele determinado no presente estudo. Os diferentes valores da CL_{50} encontrados por outros autores (TABELA 3) podem estar relacionados com as diferentes formas do selênio utilizadas nos respectivos

estudos, como também, com as diferentes espécies e tamanhos dos animais empregados nos testes (TAKAYANAGI, 2001).

TABELA 3 – Valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para diferentes espécies de peixes expostos ao selênio

Referência	Espécie	H_2SeO_3	$NaSeO_4$	$NaSeO_3$
TAKAYANAGI (2001)	*Pargus major* (juvenil)		70 mg/L	10.6 mg/L
PALAWSKI *et al*.(1985)	*Morone saxatilis* (larva)		9.8 mg/L	1.6 mg/L
US EPA (1987)	*Morone saxatilis* (juvenil)		85.8 mg/L	
HAMILTON e BUHL (1990)	*Oncorhynchus kisutch*		39.0 mg/L	32.5 mg/L
US EPA (1987)	*Cyrinodan variegatus* (juvenil)	6.7 mg/L	8.3 mg/L	

Segundo SPRAGUE (1971), a concentração sub-letal de determinado composto químico pode ser estimada pelo quociente $CL_{50\text{-}96h}/100$. Desta maneira, osteve-se, no presente trabalho, o valor de 0,0429 $mgSe^{4+}/L$, como sendo o que possivelmente não causa efeitos letais para a tilápia, *Oreochromis niloticus.* Esta concentração, no entanto, é superior e, portanto menos tóxica que a de 0,01 $mgSe^{4+}/L$, recomendada pelo CONAMA (1986) para criação de espécies destinadas à alimentação humana.

Conclusão

O presente trabalho determinou a concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$) do selenito de sódio como sendo de 4,29 $mgSe^{4+}/L$, para alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, submetidos à teste de toxicidade aguda.

Referências Bibliográficas

APHA; AWWA e WPCF. 1989. Standart Methods for the examination of water and wastewater, 17 ed. Washington, D.C: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution control Federation.

BOYD, C. E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Amsterdan: Elsevier Plublishing Company. 318p.

CARDWELL, R. D.; FREMAN, D. G.; PAYNE, T. R. e WILBUR, D. J. 1976. Acute toxicity of selenium dioxide to freshwater fishes. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 4(2): 129-144.

CASTAGNOLLI, N. 1992. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Funep. 189p.

CETESB. 1999. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1: 149p.

CONAMA. 1986. Resolução Nº 20, de 18 de Junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo 30/07/86: p. 11 – 356.

GAIKWAD, S. A. 1989. Acute toxicity of mercury, copper and selenium to the fish *Etroplus maculates*. Evironmental Ecology, 7(3): 694-696.

GERMAN, J. F. B. 1992. Toxicologia ambiental. Centro Panamericano de Ecologia e Saúde. Ed Limusa. 480p.

HAMILTON, M. A. e BUHL, K. L. 1990. Acute toxicity of boron, molybdenum and selenium to fry of chinook slamon and coho salmon. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 19: 366-373.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C. e THURSTON, R. V. 1977. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental of Science Technology, 11: 714-719.

KLAVERKAMP, J. F.; HODGINS, D. A. e LUTZ, A. 1983. Selenite toxicity and mercury selenium interactions in juvenile fish. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 12: 405-413.

NIIMI, A. J. e LAHAM, Q. N. 1976. Relative toxicity of organic and inorganic compounds of selenium to newly hatched zebrafish (*Brachydanio rerio)*. Canadian Journal of Zoology, 54: 501-509.

NOGA, E. J. 1995. Fish Disease: Diagnosis and treatment. Mosby-Year Book. St. Louis, Missori, USA. 367p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETT, J.R. e PEDINI, M. 2000. Situação atual da Aquicultura Brasileira e Mundial. P. 354-81. In VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura no Brasil – bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/ Ministério de Ciência e Tecnologia. 399p.

PALAWSKI, D.; HUNN, J. B. e DWYER, F. J. 1985. Sensitivity of young striped bass to organic and inorganic contaminants in fresh and saline waters. Trans American Fish Society, 114: 748-753.

SPRAGUE, J. B. 1971. Measuremnent of pollutant toxiciy to fish. III. Sublethal effects and safe concentrations. Water Research, 3: 793-821.

SATO, T.; OSE, Y. e SAKAI, T. 1983. Toxicological effect of selenium on fish. Environmental Pollutant, 21: 217-224.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. 1995. Limnologia aplicada à aqüicultura. Jaboticabal: Funep. 72p.

SWEE. J. T.; XIN. D.; FOO-CHING. T. e SILAS. O. H. 2002. Selenium-induced teratogenicity in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). Marine Environmental Research, 54: 605-608.

TAKAYANAGI, K. 2001. Acute toxicity of waterbone Se (IV), e Se (VI), Sb (III), and Sb (V) on red seabream (*Pargus major*). Bulletin of the Evironmental Contaminant Toxicology, 66: 808-813.

US EPA. 1987. Ambient Water Quality Criteria for Selenium. EPA 440/5-87/083, National Technical Information Service, Springfield, VA.

Capitulo 2

Alterações Hematológicas em Tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), Exposta a Concentrações Sub-Letais do Selenito de Sódio

Resumo

O objetivo deste ensaio foi estudar possíveis alterações no quadro hematológico de juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes concentrações sub-letais de selenito de sódio (Na_2SeO_3) na água e avaliar se a concentração de selênio recomendada pelo CONAMA (1996) para as águas destinadas ao cultivo de peixe. O teste foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca, em São Paulo - SP, em ambiente climatizado. Foram utilizados animais com peso médio de 30,66 ± 4,67 g e comprimento total médio de 12,11 ± 0,86 cm. As concentrações utilizadas foram: 0,40 $mgSe^{4+}/L$; 0,04 $mgSe^{4+}/L$ e 0,01 $mgSe^{4+}/L$ e mais um grupo controle, com três réplicas. O experimento foi conduzido por 14 dias, com amostragem de dois indivíduos por tratamento, nos intervalos de 0, 3, 7, 10 e 14 dias após exposição. As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal e utilizadas para as determinações de hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er) e confecção de extensões que, após a coloração pelo May-Grunwald-Giemsa, foram utilizadas para a contagem total e diferencial de leucócitos (Lc) e contagem total de trombócitos (Tr). Foram calculados o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os resultados demonstraram diferença estatística ($p<0,05$) para VCM, CHCM, HCM e Hb na concentração de 0,4 $mgSe^{4+}/L$ no terceiro dia de

coleta. O mesmo foi observado em 0,04 mgSe^{4+}/L para CHCM. No décimo dia de coleta apenas o CHCM na concentração de 0,04 mgSe^{4+}/L diferiu estatisticamente dos demais. Nas concentrações de 0,01 e 0,4 mgSe^{4+}/L ocorreu diferença estatística para CHCM no décimo quarto dia de coleta, sendo no mesmo dia observada diferença estatística ($p<0,05$) na concentração de 0,04 mgSe^{4+}/L para VCM. No terceiro dia de coleta, na concentração de 0,01 mgSe^{4+}/L, mostraram-se estatisticamente diferentes nos valores médios do número de linfócitos ($p<0,05$).

Abstract

The aim of the this paper were to study possible alterations in the hematological parameters of juveniles of tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to different sub-lethal concentrations of sodium selenite (Na_2SeO_3) in the water, and to evaluate selenite concentrations recommended by CONAMA (1986) for waters destined to fish breeding. The trial was conducted in the laboratory of aquatic organism pathology, at the Instituto de Pesca, in São Paulo - SP The trial was conducted in an acclimatized environment. Animals used were tilapia juveniles with mean weight equal to 30.66 ± 4.67 g, and mean length equal to 12.11 ± 0.86 cm. Selenite concentrations used were: 0.40 mgSe^{4+}/L; 0.04 mgSe^{4+}/L and 0.01 mgSe^{4+}/L, all of them in three replications, besides a control group. The trial lasted 14 days, and sampling consisted of two individuals per treatment in the following intervals: 0, 3, 7, 10 and 14 days after exposure. Blood samples were collected by tail puncture and used in the determination of hematocrit (Ht), hemoglobin level (Hb), erythrocyte count (Er) and production of extensions, which were stained by May-Grunwald-Giemsa, used in total and differential leukocyte counts (Lc), and thrombocyte counts (Tr). The following indices were also calculated: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Statistical results showed differences for MCV, MCHC, MCH and Hb at 0.4 mgSe^{4+}/L, on the third day of sample collection. The same was observed for 0.04 mgSe^{4+}/L and MCHC. On the tenth day of analysis, only MCHC at 0.04 mgSe^{4+}/L was statistically different ($p<0.05$). At 0.01 and 0.4 mgSe^{4+}/L, statistical difference was observed in MCHC on the fourteenth day of collection. On the same day, statistical difference was observed in 0.04 mgSe^{4+}/L for MCV. Mean counts for lymphocytes at 0.01 mgSe^{4+}/L, on the third day of sample collection, were statistically different ($p<0.05$).

Introdução

O selênio é micronutriente essencial para a sobrevivência dos animais. Quando em baixas concentrações é benéfico para o organismo participando das reações metabólicas, tais como a síntese da glutationa peroxidase (GUNBY, 1981). Além disso, atua como antioxidante intracelular, na prevenção de danos provocados por radicais livres nas membranas celulares (STADTMAN, 1980). Entretanto, quando em excesso na água é tóxico e representa ameaça à sobrevivência dos peixes, ou causando efeitos teratogênicos, comprometendo as futuras gerações (LEMLY, 2002).

Como o sangue encontra-se em contato com órgãos, tecidos e células e reage sensivelmente a todas as alterações que ai ocorrem, ele é de fundamental importância na avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos animais (KAVAMOTO *et al*., 1983, RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985, RIBEIRO *et al*., 1999, OLIVEIRA-RIBEIRO *et al*., 2000).

Os efeitos sub-letais em peixes expostos a altas concentrações de selênio, incluem redução no hematócrito e na taxa de hemoglobina, aumento do número de linfócitos circulantes, além de edemas, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aberrações cromossômicas e complicações no miocárdio e pericárdio (SORENSEN e BAUER, 1984; DEAKER e MAHER, 1997; LOW e SIN, 1998; PETERS *et al*., 1999).

A aqüicultura é uma atividade que vem crescendo em nosso meio e seu sucesso depende da qualidade da água. Um critério importante na avaliação da qualidade da água é a presença de selênio e o processo como se acumula dentro dos componentes do habitat

aquático, bem como a presença em diferentes corpos d’águas como rios, lagos, riachos, represas e outros (LEMLY, 1999).

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações hematológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus*, exposta a diferentes concentrações de selênio, bem como à comparar os resultados obtidos na concentração recomendada pelo CONAMA (1986), para águas de criação de espécies destinadas à alimentação humana.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca, em São Paulo - SP, em um ambiente climatizado (temperatura constante de 26,0 ± 0,79 ^{0}C). Os peixes utilizados foram juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de 30,66 ± 4,67 g e comprimento médio de 12,11 ± 0,86 cm (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Juvenil de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizado no teste de toxicidade crônica com selenito de sódio

O processo de aclimatação se iniciou com acondicionamento dos peixes em aquários de 60 litros, estocados de acordo com as densidades dos testes de toxicidade (0,8 g peixe/L), pelo período de 96 horas. Durante este período os animais ficaram em observação quanto ao seu estado de higidez. Em seguida, foram aclimatados por mais 48 horas em outros aquários, sob as mesmas condições de laboratório onde seriam conduzidos os testes de toxicidade crônica. A alimentação foi fornecida em forma de ração extrusada, com 38% proteína bruta, durante toda a fase de aclimatação. Após a segunda aclimatação os peixes foram acondicionados em aquários de vidro revestidos internamente com saco plástico,

preenchidos com 40 litros de água declorada quimicamente e dotados com sistema de aeração.

Como substância teste foi utilizado o selenito de sódio (Se^{4+}) do laboratório Synth®, em forma de sal, diluído na proporção de 1,666g, em 500 ml de água MILLI – Q. Este procedimento resultou em uma solução concentrada, de 1,000,00 $mgSe^{4+}/L$, denominada de solução estoque. Esta solução foi pipetada e diluída diretamente nos aquários para proporcionar as concentrações testadas.

Os aquários foram dispostos em três baterias, contendo três diferentes concentrações sub-letais e mais um grupo controle para cada réplica, totalizando 12 aquários (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade crônica do selenito de sódio realizado com tilápia, *Oreochromis niloticus*

Duas concentrações foram estimadas a partir das frações 1/10 e 1/100 da concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$), determinada no teste de toxicidade aguda, e, uma terceira, divulgada pela resolução do CONAMA (1986), como limite aceitável para a preservação de comunidades aquáticas. As concentrações testadas foram: 0,40 $mgSe^{4+}/L$ ($CL_{50\text{-}96h}/10$); 0,04 $mgSe^{4+}/L$ ($CL_{50\text{-}96h}$ /100) e 0,01 $mgSe^{4+}/L$ (CONAMA, 1986).

No inicio do experimento, coletou-se sangue de seis indivíduos antes da distribuição de peixes nos aquários, sendo caracterizados como tempo zero. O experimento foi conduzido durante 14 dias, na densidade de 16 peixes por aquário, com amostragem de dois indivíduos, por tratamento, de cada réplica, totalizando seis indivíduos por tratamento, nos intervalos 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Nesta fase, os peixes foram alimentados com ração extrusada logo após as coletas de sangue, seguido de sifonagem do excedente e de excretas e substituição de 1/3 da água, por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.

Para as análises hematológicas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína e o sangue coletado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis, previamente heparinizadas. Com as amostras de sangue, foram determinados o número de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer utilizando-se o diluente de Hayem, hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971), taxa de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944) e calculados os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), segundo WINTROBE (1934).

Foram confeccionadas lâminas de extensão sangüínea que, após a coloração pelo método de ROSENFELD (1947), foram utilizadas para a contagem diferencial e total de leucócitos (Lc) e contagem total de trombócitos (Tr), segundo a metodologia recomendada por HRUBE e SMITH (1998).

As variáveis físicas e químicas da água como temperatura (^{o}C), condutividade elétrica (μScm^{-1}), pH e oxigênio dissolvido (mg/L), foram aferidas após duas horas do início do teste e, posteriormente, após cada coleta. Ao final do experimento foram coletadas amostras de água dos aquários para as análises de dureza total, pelo método de títulometria, e teor de amônia total (mg NH_4/L), por colorimetria.

A água utilizada nos testes com selênio foi armazenada e encaminhada ao (CENA) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, para tratamento de resíduos químicos.

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey, comparando a diferença entre as médias dos tratamentos, por tempo e entre as concentrações.

Resultados e Discussão

Não foram observadas alterações nos valores das variáveis físicas e químicas da água utilizada no teste de toxicidade crônica para alevinos de tilápia, que poderiam interferir nos resultados obtidos (TABELA 1), permanecendo dentro dos limites aceitáveis para a criação de peixes (BOYD, 1982). Os altos valores de NH_4 se referem à amônia total, no entanto, a amônia em sua forma tóxica se manteve de acordo com os cálculos recomendados por NOGA (1995), com média de 0,22 mg/L, ficando assim, abaixo dos níveis de toxicidade para peixes. Ocorreu variação nos valores da condutividade elétrica nas diferentes concentrações empregadas, devido à utilização de tiossulfato de sódio em forma de sal, para a decloração da água do experimento.

TABELA 1 – Média das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus*

Concentrações ($mgSe^{4+}/L$)	**Controle**	**0,01**	**0,04**	**0,4**
Temperatura (^0C)	25,63 ± 1,30	25,46 ± 1,09	26,28 ± 0,42	26,19 ± 0,35
(Ax)	21,9 – 26,1	21,7 – 26,3	25,6 – 27,3	25,9 – 27,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,04 ± 0,70	6,29 ± 0,65	5,93 ± 0,84	6,32 ± 0,63
(Ax)	4,86 – 6,73	4,95 - 7,35	3,12 – 6,75	4,45 – 6,85
pH	7,64 ± 0,38	7,72 ± 0,32	7,80 ± 0,43	7,74 ± 0,32
(Ax)	7,25 – 8,23	7,21 – 8,29	7,0 – 8,35	7,1 – 8,25
Condutividade(µS/cm)	135,65 ± 44,59	127,11 ± 42,02	155,55 ± 58,23	116,52 ± 37,23
(Ax)	69 - 204	66,1 - 203	59,5 - 253	59,5 – 180
Amônia Total (mg NH_4/L)	13,33 ± 1,56	12,37 ± 0,82	15,90 ± 0,86	10,17 ± 1,19
(Ax)	11,2 – 13,9	11,3 – 13,3	14,9 – 15,8	9 – 11,8
Dureza (mg $CaCO_3$/L)	20.25 ± 0,92	20.25 ± 0,92	20.91 ± 0,92	22.21 ± 0,92
(Ax)	19,6 – 21,56	19,6 – 21,56	19,6 – 21,56	21,56 – 23,52

Ax = amplitude de variação da variável x

Os valores médios da taxa de hemoglobina (Hb) reduziram-se em todos os tratamentos, durante a primeira semana de experimento. Nas duas maiores concentrações (0,04 e 0,4 mgSe^{4+}/L), observou-se os menores valores em relação às demais. Os valores médios da taxa de hemoglobina no último dia de coleta apresentaram diminuição para a concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L e aumento para as outras concentrações. Os animais do grupo controle e dos mantidos na concentração de 0,01 mgSe^{4+}/L mantiveram mais constantes os valores da taxa de hemoglobina, em relação aos outros tratamentos (FIGURA 3 a).

Pela figura 3(b) verifica-se que os valores médios do hematócrito (Ht), apresentam, na primeira semana de experimento, redução em todos os tratamentos. O hematócrito dos peixes do grupo controle mantiveram-se a maior parte do tempo, acima dos demais tratamentos. Para os peixes mantidos na concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L, obteve-se o valor médio de hematócrito mais baixo de todas as concentrações.

Os valores médios do número de eritrócitos (Er), oscilaram entre 190,0 e 230,0 x 10^6/µL, tanto para o grupo controle quanto para as demais concentrações. Essa oscilação foi mais evidente na concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L (FIGURA 3 c).

Os valores médios de VCM reduziram-se em todas as concentrações, até o sétimo dia de experimento. Após este período os animais mantidos na concentração 0,4 mgSe^{4+}/L apresentaram aumento e novamente diminuição nos valores médios do VCM. Os mantidos na concentração de 0,04 mgSe^{4+}/L apresentaram elevação desses valores entre o 1° e 14° dias de coleta (FIGURA 3 d). Essa oscilação nos valores médios de VCM são reflexo das ocorridas para o número de eritrócitos e para o hematócrito. O que se verifica é que ocorreu tanto diminuição no número de células no sangue, quanto no volume das mesmas.

Os valores médios de HCM no grupo controle e nas concentrações 0,01 e 0,04 mgSe^{4+}/L apresentaram o mesmo perfil. Na concentração mais alta 0,4 mgSe^{4+}/L observou-se valores mais discrepantes do que os dos demais tratamentos (FIGURA 3 e).

As médias de CHCM do grupo controle e dos animais mantidos na concentração de 0,01 mgSe^{4+}/L apresentaram pouca variação. Nas demais concentrações esses valores oscilaram, com tendência a aumento, após o 3° dia de experimento (FIGURA 3 f). Entretanto, verificou-se pela análise estatística diferença ($p<0,05$) para VCM, CHCM, HCM e Hb na concentração de 0,4 mgSe^{4+}/L no terceiro dia de coleta. O mesmo foi observado em 0,04 mgSe^{4+}/L para CHCM. No décimo dia de coleta apenas o CHCM na concentração de 0,04 mgSe^{4+}/L diferiu estatisticamente ($p<0,05$) dos demais. Nas concentrações de 0,01 e 0,4 mgSe^{4+}/L ocorreu diferença estatística ($p<0,05$) para CHCM no décimo quarto dia de coleta, sendo no mesmo dia observada diferença estatística ($p<0,05$) na concentração de 0,04 mgSe^{4+}/L para VCM.

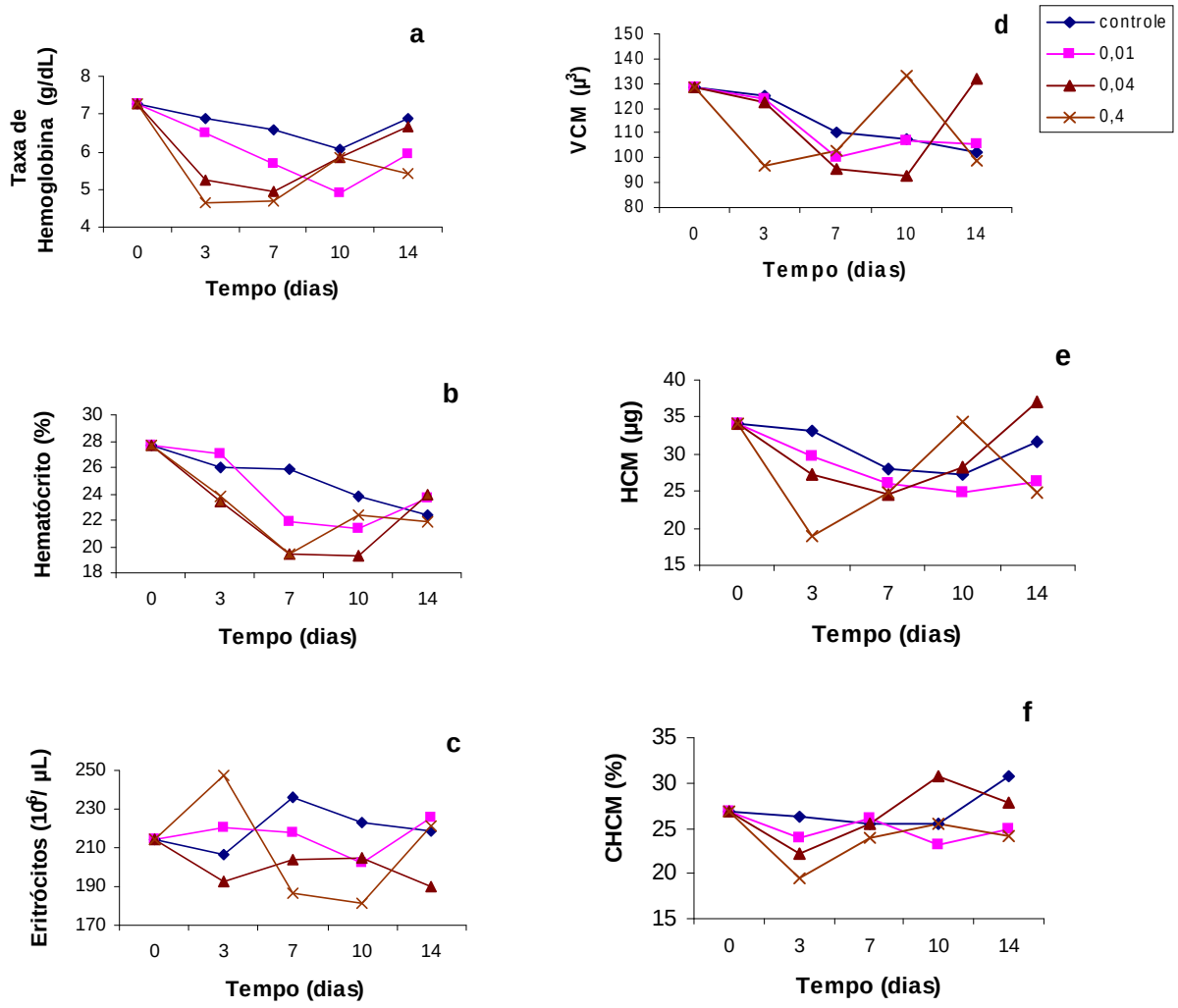

FIGURA 3 - Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos de tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta

SORENSEN *et al.* (1984) e LOHENR *et al.* (2001) observaram em *Lepomis cyanellus* coletados em rios contaminados por selênio, diminuição dos valores de hematócrito, da taxa de hemoglogina e do número de eritrócitos.

Em *Ictalurus punctatus* exposto a 3 ppm de selênio, foi notado diminuição do valor de Ht e da taxa de hemoglobina (ELLIS *et al*,.1937). A redução desproporcional dos níveis de hemoglobina comparada com a da contagem de eritrócitos, indica que o selênio interfere

na formação da hemoglobina, mais do que na eritropoiese (HILTON *et al.*, 1980; SORENSEN, 1991). Os valores de hematócrito variavam inversamente com os níveis hepáticos de selênio. Fácil de medir e com relativamente pouca variabilidade, faz do hematócrito o parâmetro hematológico escolhido na avaliação dos efeitos tóxicos de selênio em teleósteos.

SORENSEN e BAUER (1983), encontraram para *Lepomis* sp. exposto ao selênio sintomas de anemia, com redução dos valores de VCM e CHCM, associados aos baixos valores de hematócrito. A referência média de VCM para peixes é de 174 μ^3 com redução de 23% para peixes contaminados por selênio (SORENSEN, 1991).

A redução do CHCM causa diminuição da capacidade respiratória do animal, uma vez que o selênio liga-se à hemoglobina, impedindo o transporte de oxigênio (LEMLY, 2002). O número de hemoblastos reflete a diminuição da formação de eritrócitos e demora da substituição de células vermelhas do sangue circulante que também contribui para a redução da capacidade respiratória e aumento do estresse metabólico.

Quanto ao número de trombócitos, verifica-se, pela figura 4, que ocorreu aumento gradativo dos valores dos peixes em todas as concentrações de selênio, e do grupo controle. No décimo dia, notou-se um aumento significativo nos valores da concentração de 0,04 $mgSe^{4+}/L$, e queda no final do experimento, onde apenas a concentração de 0,40 $mgSe^{4+}/L$ apresentou uma tendência a aumentar.

Entretanto, pela análise estatística, verificou-se que não ocorreu diferença para os valores médios do número de trombócitos totais entre os tratamentos, que comprovasse o efeito das concentrações testadas.

LEMLY (2002) e SORENSEN *et al.* (1984), também encontraram aumento do número de trombócitos em peixes coletados em ambientes contaminados por selênio. Entretanto, esses autores referem a esta célula como parte dos glóbulos brancos, incluindo-os na contagem diferencial de leucócitos. Alguns autores mencionam que os trombócitos atuam nos mecanismos de defesa de peixes, uma vez que foram encontradas ao redor de bactérias em meios de cultura ou mesmo aderências da bactéria à superfície do trombócito e migram para o local da injúria (KOZINSKA *et al.*, 1999). Os trombócitos desempenham nos peixes um papel importante, não só da coagulação como também participam, segundo alguns autores, do processo de defesa dos organismos (MATUSHIMA e MARIANO, 1996).

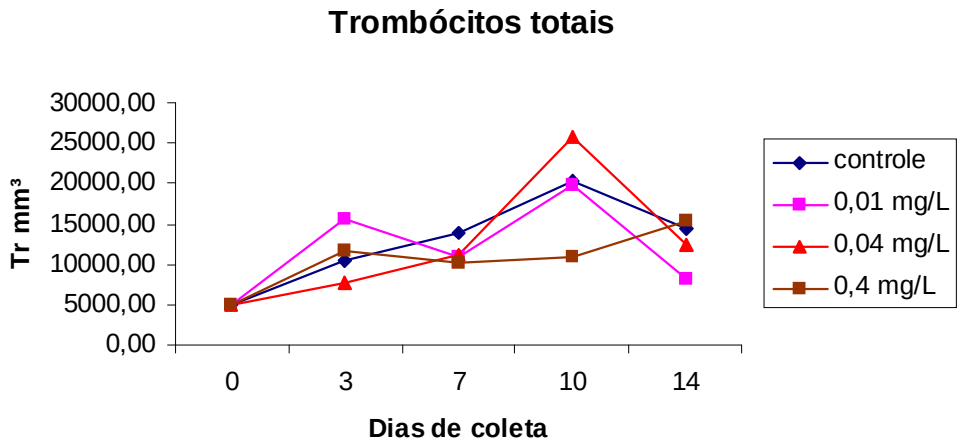

FIGURA 4 - Valores médios do número total de trombócitos (Tr) em tilápia, *O. niloticus*, exposta a várias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta

Na figura 5 encontram-se as células do sangue periférico de *O. niloticus*: neutrófilos, monócitos, célula imatura, basófilos, linfócitos, trombócitos, eritrócitos e eosinófilos.

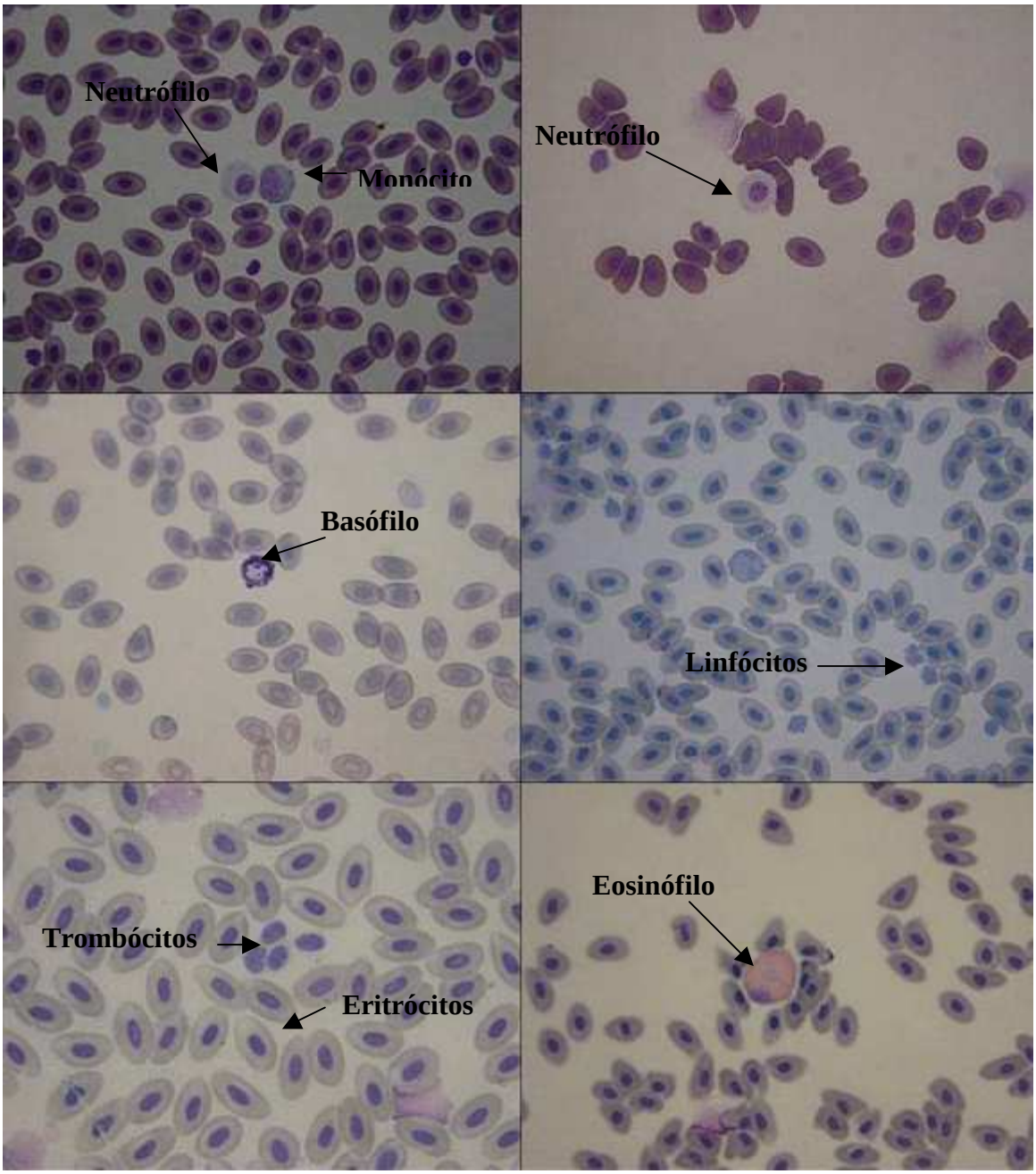

FIGURA 5 - Células sangüíneas observadas em tilápia, *O. niloticus*. Rosenfeld. 1000 x.

Os resultados da variação dos valores médios da contagem total e diferencial de leucócitos são apresentados na figura 6. De acordo com a figura 6 a, verifica-se aumento do número total de leucócitos (leucocitose) devido, principalmente, ao aumento do número de linfócitos (linfocitose). Esse aumento é verificado principalmente nas concentrações de 0,01 mgSe^{4+}/L e no grupo controle. Observou-se, ainda, aumento progressivo no número de linfócitos até o final das coletas (FIGURA 6 b).

Os neutrófilos apresentaram aumento de seu número, estabilizando-se no terceiro e sétimo dia de coleta, e apresentou tendência a diminuir no final do experimento (FIGURA 6 c). Os monócitos apresentaram aumento acentuado em seu número no terceiro dia e no décimo dia de coleta, com certa estabilidade até o fim do experimento (FIGURA 6 d).

Os basófilos foram encontrados em poucos peixes no decorrer do experimento. Foram verificados apenas nos indivíduos mantidos na concentração de 0,01 mgSe^{4+}/L, no sétimo dia de coleta (FIGURA 6 e).

Os números de células imaturas apresentaram aumento no terceiro dia de experimento seguindo até o décimo dia, e reduzindo-se bruscamente no último dia de experimento (FIGURA 6 f).

Eosinófilos foram encontrados apenas nos tratamentos controle, em apenas três indivíduos um de cada repetição.

Pela análise estatística dos dados, verificou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores médios do número de linfócitos na concentração de 0,01 mgSe^{4+}/L, no terceiro dia de coleta.

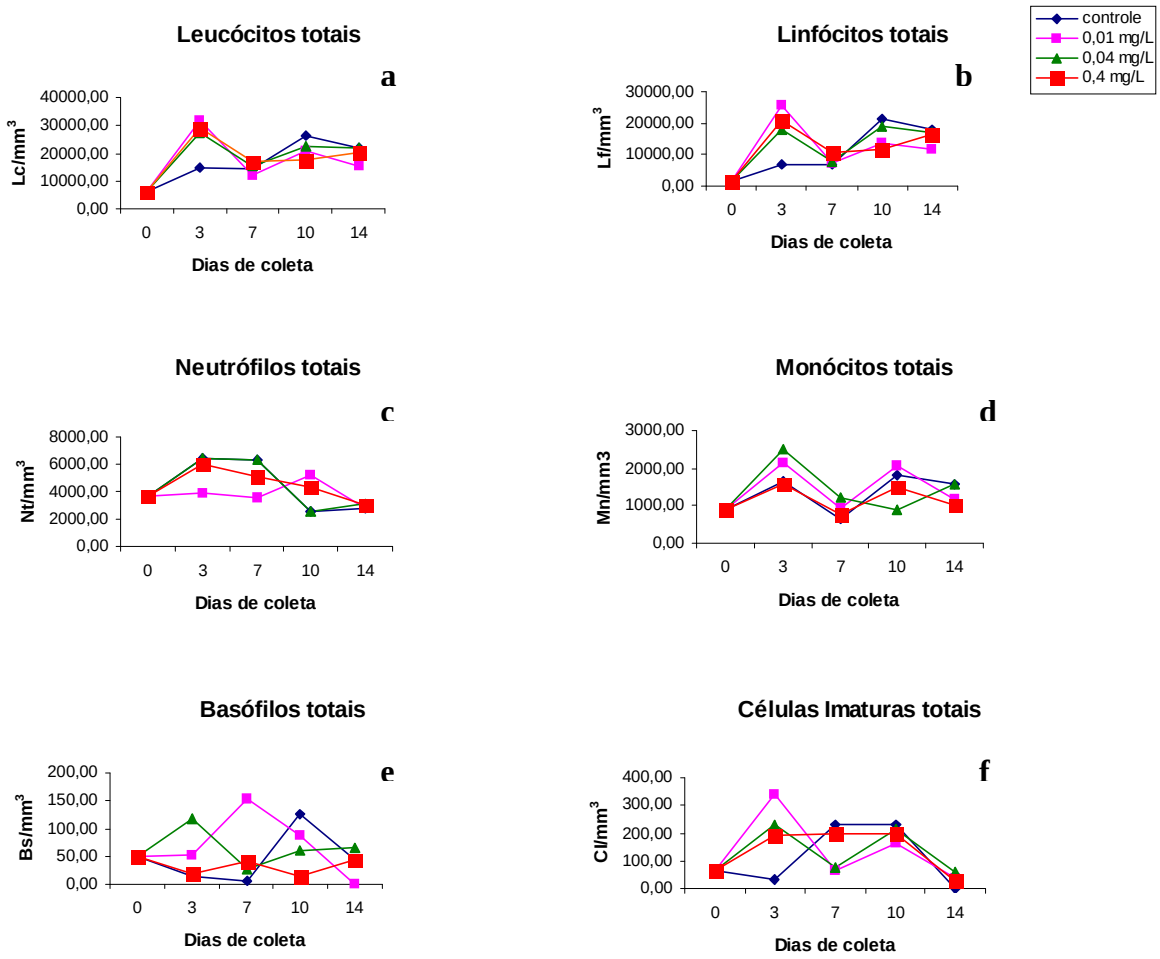

FIGURA 6 – Valores médios dos números absolutos das contagens total e diferencial de leucócitos, em sangue periférico de tilápia, *O. niloticus*, exposta a varias concentrações de selenito de sódio, nos diferentes momentos de coleta

A contagem diferencial dos leucócitos e o cálculo dos valores absolutos dos leucócitos, tal como é realizado em outros animais, é de grande valor para o diagnóstico das discrasias do sangue em peixes (HINES e YASHOUV, 1970). Essa contagem segundo

MCKIM *et al.* (1970), revela alterações morfológicas e numéricas das células sangüíneas, que podem estar associadas a várias etiologias, inclusive com as modificações do meio aquático causado por produtos tóxicos.

O aumento do número de leucócitos nos peixes pode estar relacionado com a presença de infecção (GOEDE e BARTEN, 1990). A leucocitose é relatada em várias populações de peixes expostos aos metais pesados (GILL e PANT, 1987). Porém, SORENSEN e BAUER (1983) e SORENSEN *et al.* (1984), relataram leucopenia em peixes submetidos a concentrações de selênio, que, segundo estes autores, o acúmulo do metal no fígado, impedindo a leucopoese.

Como o verificado neste trabalho, ELLIS (1976) também relata aumento do número de linfócitos em resposta à intoxicação por selênio, o que pode ser indicativo de uma resposta celular com ativação da defesa a esse metal.

Como observado no presente estudo, outros autores relatam alterações no número de leucócitos em peixes expostos ao selênio. Assim, LEMLY (1993) relata aumento do número de linfócitos (linfocitose) e diminuição no número de neutrófilos (neutropenia) em *Lepomis cyanellus*. WEEKS *et al.* (1990) e FAISAL e HUGGETT (1993), por outro lado, encontraram diminuição do número de neutrófilos em peixes estuarinos e *Leiostomus xanthurus*, respectivamente. Segundo SORENSEN (1991), a diminuição do número de neutrófilos possivelmente pode indicar à interrupção da capacidade fagocitária ou a redução da resistência dos animais às doenças.

LEMLY (2002), observou aumento no número de linfócitos em peixes coletados em lagos contaminados por selênio, como resposta generalizada do sistema imune, acionado

pelo estresse fisiológico e pela debilitação do estado de saúde. SORENSEN *et al.* (1984), notou aumento significativo do número de linfócitos em *Lepomis cyanellus* expostos ao selênio.

Os basófilos são células encontradas raramente no sangue periférico de peixes. LOHNER *et al.* (2001), observaram essas células em peixes coletados em rio contaminado por selênio, e (GILL e PANT, 1987), encontraram basófilos em peixes expostos a metais pesados.

SORENSEN e BAUER (1983), notaram redução no número de células imaturas em *Lepomis cyanellus* exposto ao selênio, como conseqüência do aumento da taxa de eritropoiese. FINLEY (1995), comenta que *Lepomis* sp. exposto ao selênio na concentração de 5 µg/L durante 180 dias, foram evidenciados diminuição no número de células imaturas e LOHNER *et al.* (2001), observou ausência de células imaturas em peixes expostos a altas concentrações de selênio.

Conclusões

Verificou-se, neste experimento que o selênio, na forma de selenito de sódio, provoca alterações no sangue de tilápia, produzindo anemia com linfocitose. A concentração de selênio recomendada pelo CONAMA (1986) considerada como segura para águas de pisciculturas, entretanto, também provocou alterações sangüíneas.

Referências Bibliográficas

BOYD, C. E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Amsterdan: Elsevier Plublishing Company. 318p.

BURGER, J.; GAINES, K. F.; BORING, C. S. e STEPHENS, W. L. 2001. Mercury and selenium in fish from the savannah river: species trophic level, and locational differences. Environmental Research, Section A, 87: 108-118.

COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. Canadian Medicine Association Journal, 50: 550-2.

CONAMA. 1986. Resolução Nº 20, de 18 de Junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo 30/07/86: p. 11 – 356.

DEAKER, M. e MAHER, W. 1997. Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. Analytica Chimica Acta, 350: 287-294.

ELLIS, A. E. 1976. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa* L. Journal of Fish Biology, 8: 143-156.

ELLIS, M. M.; MOTLEY, H. L.; ELLIS, M. D. e JONES, R. O. 1937. Selenium poisoning in fishes. Proceeding of the Sociedad of Experimental Biology Medicine, 36: 519.

FAISAL, M. e HUGGETT, R. J. 1993. Effluents of polycyclic aromatic hydrocarbons on the lymphocyte mitogenic responses in spot *Leiostomus xanthurus*. Marine Environmental, 35: 121-124.

FINLEY, K. A. 1985. Observations of bluegills fed selenium contaminated *Hexagenia nymphs* collected from Belews Lake. North Carolina. Bulletin of Environmental Contaminant Toxicology, 35: 816-825.

GATLIN, D.M. e WILSON, R.P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. Journal of Nutrition, 114: 627-633.

GILL, T. S. e PANT, J. C. 1987. Hematological and pathological effects of chromium toxicosis in the freshwater fish, *Barbus conchonius*. Water and Air soil Pollutant, 35: 816-825.

GOEDE, R. W. e BARTEN, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy based assessment as indictors of health and condition of fish. In American Fisheries Society Symposiu, 8: 93-108.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. e BROUSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology, Philadelphia, 56 (1): 59-9.

GUNBY, P. 1981. Selenium may act as cancer inhibitor. Journal of the American Medicine Association, 246: 1510.

HILTON, J. W.; HODSON, P. V. e SLINGER, S. J. 1980. The requeriment and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition, 110: 2527.

HINES, R. e YASHOUV, A. 1970. Differential leukocyte counts and total leucocyte and erythrocyte counts for some normal Israeli mirror carp. Bamidgeh, 22: 106-113.

HRUBE, T. C. e SMITH, S. A. 1998. Hematology of fish. In: Schalm`s Veterinary Hematology, 5$^{a.}$ ed. p. 1120-1125.

KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estádio de desenvolvimento gonadal maduro. Boletim do Instituto de Pesca, 10 (único): 53 – 60.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J. e KOSTRZEWA, P. 1999. Influence of thrombocytes activity on the susceptibility of the carp (*Cyprimus carpio*) to *Aeromonas hydrophila* injection at different tempetratures. Bulletin Veterinary Institute Pulawy, 43: 53-62.

LEMLY, A. D. 1993. Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. Aquatic Toxicology, 27: 133-158.

LEMLY, A. D. 1999. Selenium transport and bioaccumulation in aquatic ecosystems: A proposal for water quality criteria based on hydrological units. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42: 150-156.

LEMLY, A. D. 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. Aquatic Toxicology, 57: 39-49.

LOHENR, T. W.; REASH, R. J.; WILLET, V. E. e ROSE, L. A. 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium laden coal ash effluents. Ecotoxicology and Environmental Safety, 50: 203-216.

LOW, K.W. e SIN, Y.M. 1998. Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). The Science of the Total Environment, 214: 153 – 164.

MATUSHIMA, E.R. e MARIANO, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carregenin in the swim bladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science, 33: 5-10.

MCKIM, J.M.; CHRISTESEN, G.M. e HUNT, F.P. 1970. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short–term and long-term exposure to copper. Journal Fish Research Bvard Canadian, Ottawa, 27(1): 1883-9.

NOGA, E. J. 1995. Fish Disease: Diagnosis and treatment. Mosby-Year Book. St. Louis, Missori, USA. 367p.

NRIAGU, J.O. e PACYNA, J.M. 1988. Quantitative assessment of worlwide contamination of air, water and soil by trace metals. Nature, 333: 134 – 139.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; GUIMARÃES, J. R.D. e PFEIFFER, W. C. 1996. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 34: 190-195.

PETERS, G.M.; MAHER, W.A.; KRIKOWA, F.; ROACH, A.C.; JESWANI, H.K.; BARFORD, J.P.; GOMES, V.G. e REIBLE, D.D. 1999. Selenium in sediments, pore waters and benthic infauna of Lake Macquarie, New south Wales, Australia. Marine Environmental Research, 47: 491-508.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1985. Estudos hematológicos em curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. Boletim do Instituto de Pesca, 12 (2): 25 – 35.

RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU,C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. e TJALVE, H. 1999. Distribuition kinetics of dietary methylmercury in the Artic charr (*Salvelinus alpinus*). Environmental Science Technology, 33: 902 – 907.

ROSENFELD, G. 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Memórias Instituto Butantã, 20: 315-28.

SORENSEM, E. M. B. 1991. Metal poisoning in fish. Florida: CRC Press. 597p.

SORENSEN, E. M. B. e BAUER, T. L. 1983. Hematological dyscrasia in teleosteos chronically exposed to selenium laden effluent. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 12:135-141.

SORENSEN, E.M.B.; CUMBIE, P.M.; BAUER, T.L.; BELL, J.S.; e HARLAN, C.W. 1984. Histopathological, hematological, condition-factor, and organ weight changes associated with selenium accumulation in fish from Belews Lake, North Carolina. Archives of Evironmental Contaminantion and Toxicology, 13: 153-162.

SORENSEN, E. M. B. e BAUER, T. L. 1984. A correlation between selenium accumulation in sunfish and changes in condition factor and organ weight. Environmental Pollutant, 34: 357-366.

STADTMAN, T. C. 1980. Selenium dependent enzymes. Ann Ver Biochemistry, 49: 93 p.

WEEKS, B. A.; HUGGET, R. J.; WARINNER, J. E. e MATHEWS, E. S. 1990. Macrophage responses of estuarine fish as bioindicators of toxic contamination. In biomakers of environmental contamination. J. McCarthy and L. Shugart. Eds. 193-201.

WINTROBE, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. Folia Haematologica, Leipzig, 51: 32-49.

Capítulo 3

Alterações Histopatológicas em Tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), Exposta a Concentrações Sub-Letais do Selênio

Resumo

O objetivo deste ensaio foi estudar possíveis alterações histopatológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,1757), exposta a diferentes concentrações sub-letais de selenito de sódio (Se^{4+}) na água e avaliar a concentração de selênio recomendada pelo CONAMA (1986) para as águas destinadas ao cultivo de peixe. O teste foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca, em São Paulo - SP, em um ambiente climatizado. Foram utilizados juvenis com 30,66 ± 4,67 g de peso e 12,11 ± 0,86 cm de comprimento, expostos às concentrações de 0,40 $mgSe^{4+}/L$; 0,04 $mgSe^{4+}/L$ e 0,01 $mgSe^{4+}/L$ (CONAMA, 1986), e mais um grupo controle, em três réplicas. O experimento foi conduzido por 14 dias, com amostragem de dois indivíduos por tratamento nos intervalos de 0, 3, 7, 10 e 14 dias de cada indivíduo. Foram coletados fragmentos de brânquias, fígado e rim, fixados em formol 10%, por 24 horas à temperatura ambiente, posteriormente transferido para solução de álcool 70%, armazenados em frascos e depois processados para inclusão em parafina. Cortes de 6 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina. As alterações histopatologicas nas brânquias foram edema e hiperplasia. Os rins apresentaram, degeneração vacuolar tubular, glomérulonefrite, nefrose, nefroesclerose, calcificação tubular, edema e hemorragia.

Abstract

The aim of this trial were to study possible histopathological alterations in tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to different sublethal concentrations of sodium selenite (Se^{4+}) in water and to evaluate selenium concentration recommended by CONAMA (1986) for waters used in fish breeding. The trial was conducted in the laboratory of aquatic organism pathology, at the Instituto de Pesca, in São Paulo – SP. The trial was conducted in an acclimatized environment. Animals used were tilapia juveniles with mean weight equal to 30,66 ± 4,67 g, and mean length equal to 12,11 ± 0,86 cm, exposed to selenium concentrations equal to 0.40 mgSe^{4+}/L; 0.04 mgSe^{4+}/L and 0.01 mgSe^{4+}/L (CONAMA, 1986), in three replications, besides a control group. The trial lasted 14 days, and sampling consisted of two individuals per treatment in the following intervals: 0, 3, 7, 10 and 14 days. Fragments of branchia, liver and kidneys were collected and fixed and formaldehyde 10% for 24 hours at room temperature. They were then transferred to alcohol 70% and placed in jars to be later on included in paraffin. Six-µm thick sections were produced and stained using hematoxilin-eosin. Histopathological alterations observed in branchia were edema and hyperplasia. Kidneys presented vacuolar tubular degeneration, glomerulonephritis, nephrosis, nephrosclerosis, tubular calcification, edema and hemorrhage.

Introdução

As atividades industriais e humanas promovem a introdução e bioacumulação do selênio nos ecossistemas aquáticos (LEMLY, 1999). A presença do selênio em altas concentrações na água representa ameaça à sobrevivência dos peixes, causando efeitos teratogênicos e comprometendo as futuras gerações (LEMLY, 1985).

LOHNER *et al.* (2001), comentam que o selênio é causador de irregularidades hematológicas, como a redução do hematócrito, anormalidades histopatológicas, edema, necroses, anormalidades no fígado, ovários e brânquias causados.

Estudos sub-letais de toxicidade utilizando peixes permitem avaliar seus efeitos pelos danos nos tecidos (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al*., 2000). SORENSEN *et al.* (1984), observou em *Lepomis cyanellus* expostos ao selênio, inchaço das lamelas brânquiais, necroses hepáticas e degeneração dos folículos ovárianos. PETERS *et al*. (1999) e DEAKER e MAHER, (1997), notaram redução no hematócrito e na taxa de hemoglobina, edemas, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aberrações cromossômicas e complicações no miocárdio e pericárdio em peixes expostos à altas concentrações de selênio.

SORENSEN *et al.* (1982), relatam necroses renais, glomerulonefrite em *Lepomis* sp. coletados em lago contaminado por selênio.

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações histopatológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus*, exposta a diferentes concentrações de selênio, e comparamdo-as com a concentração recomendada pelo CONAMA (1986), para águas de criação de espécies destinadas à alimentação humana.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca em São Paulo - SP, em ambiente climatizado (temperatura constante de 26,0 ± 0,79 ^{0}C). Os peixes utilizados foram juvenis de tilápia, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de 30,66 ± 4,67 g e comprimento médio de 12,11 ± 0,86 cm. O processo de aclimatação se iniciou com o acondicionamento dos peixes em aquários de 60 litros, estocados de acordo com as densidades dos testes de toxicidade (0,8 g peixe/L), pelo período de 96 horas. Durante este período os animais ficaram em observação para se determinar possíveis doenças, presença de parasitos ou danos físicos. Em seguida, foram aclimatados por 48 horas em aquários, sob as mesmas condições de laboratório. A alimentação foi fornecida em forma de ração extrusada, com 38% pb, durante toda a fase de aclimatação. Após a segunda aclimatação os peixes foram acondicionados em aquários de vidro revestidos internamente com saco plástico, preenchidos com 40 litros de água declorada e dotados com sistema de aeração.

A substância teste utilizada foi o selenito de sódio (Se^{4+}) do laboratório Synth®. O produto em forma de sal foi diluído na proporção de 1,666g em 500 mL de água MILLI – Q. Este procedimento resultou em solução concentrada do selenito de sódio, de 1,000,00 mgSe^{4+}/L, denominada de solução estoque. Esta solução foi pipetada e diluída diretamente nos aquários em quantidade suficiente para proporcionar as concentrações testadas.

Os aquários foram dispostos em três baterias simultâneas, contendo três diferentes concentrações sub-letais e mais um grupo controle para cada réplica, totalizando 12 aquários. Duas concentrações foram estimadas a partir das frações 1/10 e 1/100 da concentração letal média ($CL_{50\text{-}96h}$), determinada no teste de toxicidade aguda e uma terceira, divulgada pela resolução do CONAMA (1986) como limite aceitável para a

preservação de comunidades aquáticas. As concentrações testadas foram as seguintes: 0,40 mgSe^{4+}/L (CL_{50-96h}/10); 0,04 mgSe^{4+}/L (CL_{50-96h}/100) e 0.01 mgSe^{4+}/L (CONAMA, 1986).

O experimento foi conduzido durante 14 dias na densidade de 16 peixes por aquário, com amostragem de dois indivíduos por tratamento de cada réplica, totalizando seis indivíduos por tratamento, nos intervalos 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Nesta fase, os peixes foram alimentados com ração extrusada após as coletas, seguidas de sifonagem do excedente e substituição de 1/3 da água, por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.

Para as análises histopatológicas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína e coletados, de cada indivíduo fragmentos de brânquias e rim, fixados em formol 10%, por 24 horas à temperatura ambiente, transferidos para solução de álcool 70% e armazenados em frascos. Posteriormente os fragmentos foram processados para a inclusão em parafina. Os cortes histológicos realizados foram de 6 μm de espessura e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. As variáveis físicas e químicas da água como temperatura (^{o}C), condutividade elétrica (μScm^{-1}), pH e oxigênio dissolvido (mg/L), foram monitoradas após duas horas do início do teste, e posteriormente, após cada coleta. Ao final do experimento foram coletadas amostras de água dos aquários e para as análises de dureza total, pelo método de títulometria e teor de amônia total (mg/L) por colorimetria.

A água utilizada nos testes com selênio foi armazenada e encaminhada ao (CENA) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, para tratamento de resíduos químicos.

Resultados e Discussão

Não foram observadas alterações nos parâmetros físicos e químicos da água utilizada no teste de toxicidade crônica para alevinos de tilápia que pudessem interferir nos resultados obtidos (TABELA 1). Os altos valores de NH_4 se referem à amônia total, no entanto, a amônia em sua forma tóxica se manteve de acordo com os cálculos realizados por NOGA (1995), com média de 0,22 mg/L, ficando assim, abaixo dos níveis de toxicidade para peixes, entre 0,6 a 2,0 mgNH_3/L. Ocorreu variação da condutividade elétrica nas diferentes concentrações empregadas no teste, devido à utilização de tiossulfato de sódio em forma de sal para a decloração da água utilizada no experimento.

TABELA 1 – Média das variáveis físicas e químicas da no teste de toxicidade crônica de selenito de sódio em *Oreochromis niloticus*

Concentrações (mgSe^{4+}/L)	**Controle**	**0,01**	**0,04**	**0,4**
Temperatura (^{0}C)	25,63 ± 1,30	25,46 ± 1,09	26,28 ± 0,42	26,19 ± 0,35
(Ax)	21,9 – 26,1	21,7 – 26,3	25,6 – 27,3	25,9 – 27,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,04 ± 0,70	6,29 ± 0,65	5,93 ± 0,84	6,32 ± 0,63
(Ax)	4,86 – 6,73	4,95 - 7,35	3,12 – 6,75	4,45 – 6,85
pH	7,64 ± 0,38	7,72 ± 0,32	7,80 ± 0,43	7,74 ± 0,32
(Ax)	7,25 – 8,23	7,21 – 8,29	7,0 – 8,35	7,1 – 8,25
Condutividade(µS/cm)	135,65 ± 44,59	127,11 ± 42,02	155,55 ± 58,23	116,52 ± 37,23
(Ax)	69 - 204	66,1 - 203	59,5 - 253	59,5 – 180
Amônia Total (mg NH_4/L)	13,33 ± 1,56	12,37 ± 0,82	15,90 ± 0,86	10,17 ± 1,19
(Ax)	11,2 – 13,9	11,3 – 13,3	14,9 – 15,8	9 – 11,8
Dureza (mg $CaCO_3$/L)	20.25 ± 0,92	20.25 ± 0,92	20.91 ± 0,92	22.21 ± 0,92
(Ax)	19,6 – 21,56	19,6 – 21,56	19,6 – 21,56	21,56 – 23,52

Ax = amplitude de variação da variável x

Os exemplares amostrados no início do experimento, nomeados de momento zero, demonstraram estruturas morfológicas normais nas brânquias e nos rim.

Nos exemplares da concentração controle (FIGURA 1), não foram observadas alterações histológicas nas brânquias e nem no rim, coletados no diferentes tempos.

Nas concentrações 0,01 e 0,04 $mgSe^{4+}/L$, não foram observadas alterações histológicas nas brânquias dos peixes, até o final do experimento.

Nos animais mantidos na concentração 0,4 $mgSe^{4+}/L$, observou-se, no décimo dia de coleta, alterações nas brânquias, como hiperplasia (FIGURA 2), sendo este quadro mais grave no décimo quarto dia.

No sétimo dia de coleta, o rim dos animais da concentração de 0,04 e 0,4 $mgSe^{4+}/L$ (FIGURA 3), apresentou nefrose, caracterizada pela degeneração vacuolar tubular e glomerulonefrite, resultante de necrose ou infecção secundária.

No décimo dia de coleta os peixes mantidos na concentração 0,4 $mgSe^{4+}/L$, apresentaram o rim com atrofia glomerular e glomeruloesclerose (FIGURA 6). No décimo quarto dia de coleta, ocorreu glomerulonefrite proliferativa, nefrose, nefroesclerose, calcificação tubular, edemas e hemorragia (FIGURA 4 e 5).