

ANÁLISE DE EFLUENTE E HISTOLOGIA DA PELE, FÍGADO E RIM DE PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) SUPLEMENTADOS COM CROMO TRIVALENTE

Rodrigo Yudi FUJIMOTO ¹; Claudinei da CRUZ ¹; Flávio Ruas de MORAES ^{1,2}

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar histologicamente a pele, o fígado e o rim de pacus jovens submetidos à alimentação suplementada com cromo trivalente e avaliar a presença de resíduo de cromo na água efluente. Para tanto, foram utilizados pacus com peso médio de 100 g distribuídos num delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x2, sendo quatro níveis de cromo (0, 6, 12, 18 mg/L), duas densidades de estocagem (4 e 20 kg/m³), com quatro repetições, durante 90 dias. Histologicamente ocorreu aumento do número de células calciformes e células clava na epiderme dos pacus suplementados com 18 mg de cromo/kg, em qualquer densidade de estocagem. No fígado observou-se o mesmo efeito da alta densidade que ocorreu na epiderme, sendo que na densidade mais alta (20 kg/m³) as alterações já ocorreram no nível de 6 mg/kg de inclusão de cromo, inicialmente com congestão do sinusóide e agravando no nível de 18 mg/kg com necrose. O rim não apresentou alterações morfológicas visíveis quando suplementados e submetidos às densidades de estocagem. Porém, a concentração de cromo no efluente produzido estava abaixo do recomendado pelas normas brasileiras. Assim, podemos concluir que o nível de 18 mg/kg de suplementação não se mostrou benéfico e que a densidade de estocagem devido ao possível estresse provocado, acelera o processo de alteração histológica dos tecidos.

Palavras-chave: Suplementação de cromo; efluente; histopatologia; peixes

ANALYSIS OF EFFLUENTS AND HISTOLOGY OF SKIN, LIVER AND KIDNEY THE OF PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) SUPPLEMENTED WITH TRIVALENT CHROMIUM

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the skin, liver and kidney histology of young pacus supplemented in diet with trivalent chromium and to evaluate the residue of chromium in water effluent. Randomised delineation by using factorial scheme 4x2, with four levels of chromium (0, 6, 12, 18 mg/L), two stocking densities (4 and 20 kg/m³), and four repetitions were used. Pacus with 100 g were used, for 90 days. An increase of the number of mucus cells and club cells in the epidermis of the pacus supplemented with 18 chromium mg/kg was observed in any stocking density. The same effect was observed in the liver, and in the highest density (20 kg/m³) the alterations already occurred at the level of 6 mg/kg with the inclusion of chromium, initially with congestion of sinusoids and getting worse at the level of 18 mg/kg with necrosis. The kidney didn't present visible morphologic alterations when supplemented and submitted to the stocking densities. The concentration of chromium in the effluent of pacus was 3.27 µg/L in the higher level of supplementation (18 mg/L). In conclusion the level of 18 supplement mg/kg was not shown beneficial to the growth of pacus and the stocking density, due to the possible stress, accelerated the alteration histology process of tissues.

Key-Words: Supplement of chromium; effluents; histopathology; fish

Artigo Científico: Recebido em 23/08/2006; Aprovado em: 28/06/2007

¹ Centro de Aqüicultura da UNESP, campus de Jaboticabal - SP

² Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal
Endereço/Address: Depto de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Jaboticabal. Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14870-000, Jaboticabal, São Paulo. E-mail: cruzcl@yahoo.com

INTRODUÇÃO

O cromo pode ser encontrado em diversas valências, cromo hexavalente, trivalente, divalente e Cr^0 , sendo que dentre estes, o que apresenta grandes riscos à saúde é o cromo hexavalente, considerado carcinogênico (DE FLORA, 2000) e mutagênico (INSTITUTE OF MEDICINE, 2003). O cromo hexavalente atravessa facilmente as membranas celulares e dentro da célula reage com as proteínas e os ácidos nucleicos ocorrendo a sua redução até Cr^{+3} . Esta reação com os ácidos nucleicos é a base da propriedade carcinogênica do cromo (MORDENTI *et al.*, 1997).

O cromo no estado trivalente dificilmente atravessa as membranas das células e é pouco reativo (MORDENTI *et al.*, 1997), sendo considerado de baixa toxicidade ou virtualmente não tóxico, especialmente, na forma orgânica. Sua relação de concentração útil e concentração tóxica são aproximadamente de 1:10000, ou seja, pode ser considerado muito seguro para o uso em nutrição (WHO, 1986).

Segundo ANDERSON (1981), o cromo trivalente tem sido amplamente estudado em humanos porque promove um crescimento e desenvolvimento normal dos indivíduos suplementados.

Muitos estudos comprovam que o cromo na sua forma trivalente, desde que ministrado dentro de níveis de segurança, não causa problemas para a saúde dos homens e animais (ANDERSON, 1981; IPCS, 1988; HERTZ *et al.*, 1989; ANDERSON, 1994; HASTEN *et al.*, 1997; HOSSAIN *et al.*, 1998; DE FLORA, 2000; TAGLIARI *et al.* 2004). Porém, a concentração de cromo trivalente e hexavalente na água é regulada pela reação de oxi-redução, ou seja, a transformação do cromo trivalente em hexavalente ou vice versa, que pode acontecer apenas na presença de outro par redox, no qual recebe ou libera os três elétrons necessários para ocorrer à reação. Em ambientes aquáticos poluídos a concentração de oxigênio é baixa e a redução do cromo trivalente para hexavalente é favorecida, sendo facilmente absorvido por seres constituintes do ecossistema local (RICHARD e BOURG, 1991).

Segundo PAPOUTSOGLU *et al.*, (1998) o estresse de densidade entre outros efeitos, diminui a concentração do oxigênio, que poderiam beneficiar a reação do cromo trivalente em hexavalente. O estresse crônico por alta densidade de estocagem é observado em diversas criações de diferentes espécies de peixes como "red porgy", *Pagrus pagrus*, (ROTLLAND *et al.*,

1997) e "gilthead seabream", *Sparus aurata*, (TORT *et al.*, 1996; MONTERO *et al.*, 1999).

O Conselho Nacional do Meio ambiente (CONAMA, 1986) considerando a saúde e o bem estar humano, bem como, o equilíbrio ecológico aquático estabelece valores limitantes para as concentrações de cromo, indicando valores de 0,05 mg de cromo hexavalente/L de água e 0,5 mg de cromo trivalente/L de água para águas classe 2 que são as destinadas a piscicultura e limites de 0,5 mg de cromo hexavalente/L e 2,0 mg de cromo trivalente/L para seus efluentes.

SHIAU e LIANG (1995) e PAN *et al.*, (2003), observaram que o cromo pode bioacumular em peixes em sistemas de criação com de recirculação de água. Assim, podemos verificar que peixes que são mantidos em alta densidade de estocagem, com baixo fluxo de água e baixa concentração de oxigênio podem ser mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do cromo em níveis mais elevados e por maiores períodos. Pois, segundo ALZEMI *et al.*, (1996) *apud* ROBERTS e ORIS (2004) afirmaram que o cromo hexavalente induziu alterações histológicas como hiperplasia de lamelas das brânquias, fusão das lamelas secundárias e aumenta o número de células secretoras de muco no peixe *Gnathonemus petersii*.

Com base no exposto este trabalho teve como objetivo avaliar histologicamente o efeito do cromo na pele, fígado e rim de pacus jovens suplementados com quatro níveis de cromo (0, 6, 12, 18 mg/L) em duas densidades de estocagem (4 e 20 kg/m³).

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Núcleo de Pesquisas e Estudos Ambientais em Matologia/NEPEAM e no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura UNESP, câmpus de Jaboticabal.

Para a realização do experimento foram utilizados 32 tanques com capacidade de 500 L, abastecidos continuamente com água proveniente de poço semi-artesiano. Previamente ao início do experimento, os peixes foram adaptados às condições experimentais por dez dias, quando foram acondicionados e alimentados de acordo com as recomendações usuais de manejo. A duração do período experimental foi de 90 dias.

Os pacus jovens (*P. mesopotamicus*) (n = 1536), utilizados neste experimento, apresentaram peso médio de 100 g, divididos em dois grupos: um

mantido em alta densidade de estocagem (20 kg/m³, D20); e o outro na densidade controle (4 kg/m³, D4), conforme ROTLLAND *et al.*, (1997), distribuídos num delineamento inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 4x2, sendo quatro níveis de cromo (0, 6, 12, 18 mg/kg, sendo CO, C6, C12, C18); duas densidades de estocagem (4 kg/m³ e 20kg/m³) com quatro repetições.

Para alimentação foi formulada uma dieta basal contendo 26 % de PB e 4100 kcal de EB, na qual foi adicionado o cromo trivalente de acordo com o delineamento proposto. Devido à quantidade relativamente pequena de mineral que foi adicionada, foi realizada uma pré-mistura com 10 kg da ração basal antes de se homogeneizar com o restante de cada partida. Após homogeneização, as dietas foram peletizadas e estocadas em sacos escuros a 10 °C até o momento do uso.

A ração utilizada apresentou a seguinte fórmula e composição básica: 13% de farinha de peixe; 23% de farelo de soja; 21% de farelo de trigo; 25% de milho moído; 16% de farelo de arroz; 1% de óleo de soja; e 1% de suplemento vitamínico e mineral e com e composição básica calculada: de 26% proteína bruta; 6,23% de extrato etéreo; 41 kcal/kg de ração de energia bruta; e a relação Ca:P de 1,45:1.

Os peixes foram alimentados uma vez ao dia (9:00h), sendo a ração fornecida à vontade, até que não ocorresse mais procura pelo alimento. Semanalmente, foram monitoradas as variáveis de qualidade de água, tais como: temperatura da água, pH, o oxigênio dissolvido e a condutividade, e quinzenalmente, a amônia total.

Ao final do experimento, amostras do efluente dos tanques de criação foram coletadas para determinação das concentrações de cromo. Para tanto, foram coletados dois litros de água de efluentes de cada tanque experimental. Os procedimentos adotados para a determinação de teores de cromo trivalente foram os descritos no método 3050b da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2005).

Para avaliação histológica, ao final do período experimental, foram utilizados oito peixes de cada tratamento. Desses animais foram coletados fragmentos de pele, fígado e rim. Estes fragmentos foram fixados em bouin, por 24 horas e posteriormente conservados em álcool 70%. A seguir foi realizada a inclusão em histosec® (Merck). Após inclusão, foi realizada a microtomia, obtendo-se cortes histológicos de 5 µm com auxílio de navalha descartável em

micrótomo automático (LEICA, RM-2155).

Oscortes histológicos foram corados hematoxilina/eosina (HE) e reagidos em PAS de acordo com preconizados por BEHMER *et al.*, (1976).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise residual de cromo trivalente no efluente é fundamental para o desenvolvimento da tecnologia de utilização de suplementação de cromo em dietas para peixes, pois atualmente devido à preocupação com o impacto ambiental, a piscicultura tem sido considerada uma atividade potencialmente poluente.

Na Tabela 1 pode-se observar que o maior valor residual foi de 3,27 µg.L⁻¹, originado na densidade mais alta e com maior nível de cromo (18 mg.kg⁻¹), porém esse valor ainda está abaixo do preconizado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1986) de 2,0 mg de cromo trivalente/L, para águas classe dois, ou seja, aquelas provenientes de pisciculturas e para proteção de comunidades aquáticas, mostrando assim que a adição de cromo nos níveis utilizados neste trabalho não foi nocivo ao ambiente e ao homem.

Tabela 1. Análise da concentração residual de cromo trivalente (µg/L) nas águas do efluente ao final do experimento. Onde C são os níveis de cromo na ração (0, 6, 12, 18 mg.kg⁻¹) e D são as densidades de estocagem (4 e 20 kg/m³)

Tratamento	Concentração de cromo
C0D4	2,55
C6D4	2,31
C12D4	2,44
C18D4	2,16
C0D20	2,87
C6D20	2,80
C12D20	2,56
C18D20	3,27

Em estudo de contaminação ambiental realizado por AKIF *et al.*, (2002), os resíduos de cromo na água foram de 0,5 a 0,8 mg/L em rios que recebem efluentes de indústria têxtil. Em sedimento de rio que recebe efluentes de refinaria de petróleo, o resíduo de cromo foi de 2,5 mg/kg (BEG *et al.*, 2001) e de 10 a 240 µg/L em rios efluentes de indústria de calcário e mineral em Minas Geras, Brasil (JORDÃO *et al.*, 2002). Estes valores estão acima dos encontrados para

os efluentes gerados pela suplementação de cromo para a criação de pacu, indicando que esta atividade liberaria efluentes dentro das normas da legislação ambiental brasileira (CONAMA, 1986). Além disso, MORDENTI *et al.*, (1997) afirmaram que o cromo trivalente dificilmente atravessa as membranas celulares, não sendo absorvido pelos organismos aquáticos e nem pelas brânquias dos peixes.

A epiderme dos pacus jovens, nos tratamentos sem cromo (0,0 mg/kg) em qualquer densidade (4 e 20 kg/m³, correspondente aos tratamentos C0D4 e C0D20) é composta por um epitélio estratificado pavimentoso com três camadas de células: camada basal composta por dois tipos de células cilíndricas, uma com citoplasma claro e núcleo central denominada de células clavadas e outro tipo com citoplasma róseo e núcleo apical, a intermediária com células arredondadas com citoplasma róseo e núcleo central e a camada externa.

Nesta última camada ocorrem as células achatadas e pavimentosas e células calciformes. As células calciformes apresentam formato arredondado e ocorrem na camada superficial e intermediária da epiderme. As células calciformes são responsáveis pela produção de muco substâncias neutras PAS positivas (Figura 1a). Segundo ALZEMI *et al.* (1996) *apud* ROBERTS e ORIS (2004) o cromo, na forma hexavalente, pode ter efeito sobre estas células, aumentando seu número, provavelmente como uma resposta de proteção ao agente químico agressor. Para LEE *et al.* (1996) as mudanças em número e dimensão de células de muco e células cloreto podem ser um indicador de um processo patológico ou inflamatório induzido pelo ambiente.

A pele dos peixes dos tratamentos C6D4 e C6D20 apresentava-se semelhante histologicamente à pele dos peixes dos tratamentos sem cromo (C0D4 e C0D20), porém na densidade mais alta (C6D20) ocorreu um aumento no número de células calciformes (Figura 1b) em relação aos tratamentos sem a adição de cromo. Pode-se observar pela reação de PAS que o número de células calciformes é menor nos tratamentos isentos de cromo do que os outros tratamentos (Figura 1c). Com o aumento no nível de cromo para 12 e 18 mg/kg de ração observou um aumento do número de células calciformes (Figura 1d), principalmente, na camada superficial da epiderme, tanto na densidade mais baixa (4 kg/m³) quanto na densidade mais alta (20 kg/m³), pois outra função importante da pele é a secreção de muco, para

a defesa natural contra parasitos e microrganismos patogênicos (FLETCHER, 1978), pois possuem lisozimas e outras proteínas antibacterianas (FAST *et al.*, 2002).

Na densidade de estocagem mais alta (20 kg/m³), pode-se observar que com o menor nível de cromo (6 mg/kg) aumentou a ocorrência de células calciformes em relação aos tratamentos sem adição de cromo, evidenciando que o possível estresse prolongado prejudica o desenvolvimento e a resposta a agentes agressores. ANDERSON (1994) ressaltou que animais em condições estressantes excretaram maior quantidade de cromo para o ambiente e diminuindo suas reservas de cromo e aumentando assim sua exigência nutricional do mineral.

Concomitantemente ao aumento de células calciformes ocorreu aumento da ocorrência de células clavadas. Estas células secretam proteínas, glicoproteínas e gotículas de óleo, além disso, são responsáveis segundo ROBERTS (1981) pela liberação de uma substância de alarme.

Com base nas alterações histológicas na pele dos peixes pela liberação do cromo na ambiente de cultivo e a ingestão de cromo pela dieta podem causar alterações visíveis, portanto sua toxicidade real deve ser melhor estudada.

Histologicamente, o fígado de pacus jovens alimentados com dieta sem adição de cromo em qualquer densidade se caracteriza por uma distribuição cordonal dos hepatócitos e os sinusóides se encontram irregularmente distribuídos entre os hepatócitos, revestidos com células endoteliais. Os hepatócitos apresentavam citoplasma claro com núcleo central e formato arredondado e em algumas regiões deslocado para a periferia da célula (Figura 2a). Estas descrições morfológicas estão de acordo de GRIZZLE e ROGERS (1985) para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e de SOUZA *et al.*, (2001) para o pacu (*Piaractus mesopotaminus*).

Na densidade mais alta (20 kg/m³) as alterações histológicas apareceram no menor nível de cromo (6 mg/kg). Neste tratamento (C6D20) o fígado manteve arranjo cordonal dos hepatócitos normal, similar ao observado nos tratamentos com 0 mg/kg de cromo, porém com algumas regiões com congestão nos sinusóides (Figura 2b).

Nos tratamentos com cromo na densidade mais baixa somente apresentaram alterações os peixes suplementados com 18 mg de cromo/kg de ração. Os peixes alimentados com essa ração apresentaram

arranjo cordonal dos hepatócitos normal, mas em algumas regiões, ocorreu fusão das células e pouco glicogênio no interior dos hepatócitos (Figura 2c).

A partir do nível de 12 mg de cromo/kg de ração ocorre um desarranjo da estrutura cordonal dos hepatócitos (Figura 2d). Ainda ocorreu aumento do volume dos hepatócitos com deslocamento do núcleo para periferia, semelhante ao encontrado no tratamento C18D4 (Figura 2c) e também pontos de necrose (Figura 2d).

Segundo TAGLIARI *et al.*, (2004) o cromo na forma hexavalente provoca alterações prejudiciais aos órgãos como o rim e o fígado dos animais. As alterações como a necrose e fusão celular encontradas com a adição de cromo no presente trabalho, podem trazer prejuízos ao funcionamento dos principais órgãos dos peixes,, sendo necessário conhecer o nível ideal de cromo para pacus sem que ocorra perda de qualidade de carcaça, sem impacto ambiental, sem prejuízos para os peixes e para o homem.

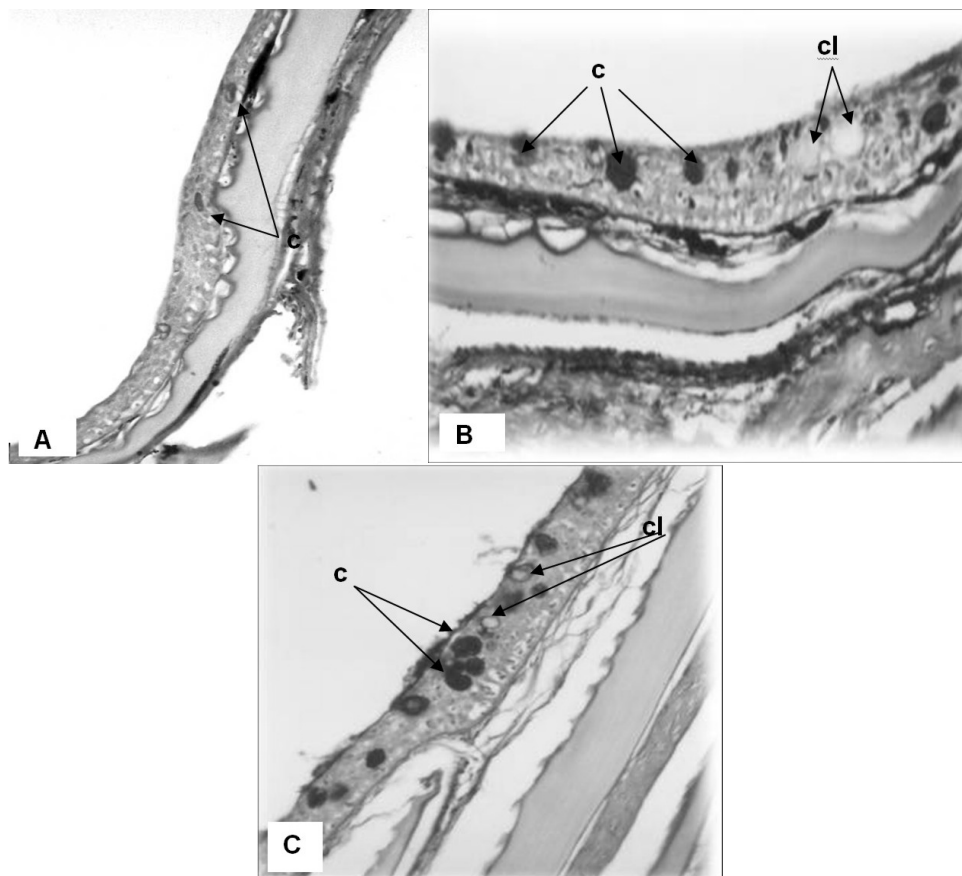


Figura 1. Fotomicrografia da pele de pacus jovens. **A)** Estrutura da epiderme no tratamento 0 mg de cromo/ kg de ração, na densidade de 4 kg/m³, células caliciformes (c) e de células clavadas (cl) na epiderme, PAS. 100 x. **B)** Detalhe do aumento de número de células caliciformes (c) e de células clavadas (cl) na epiderme. Tratamento 6 mg de cromo/ kg de ração e 20 kg/m³, PAS. 200x. **C)** Aumento de número de células caliciformes (c) e de células clavadas (cl) na epiderme. Tratamento 12 mg de cromo/ kg de ração e 4 kg/m³, PAS. 200x

ANDERSON *et al.*, (1997) *apud* BERNER *et al.*, (2004) não encontraram alteração no fígado de ratos alimentados com cromo trivalente durante 20 semanas. Uma hipótese de os peixes apresentarem lesões no fígado pode ser o fato de que o cromo excretado permanece no meio de cultivo, pois segundo PAN *et al.* (2003) estudando cromo em sistemas de recirculação de água a acumulação do cromo no meio de cultivo potencializa a sua ação.

Outro fato importante é que a densidade de estocagem permitiu que com o menor nível de cromo já ocorresse alterações como a congestão sanguínea nos sinusóides. Fato relevante já que a qualidade de água influencia na reação de oxirredução, na transformação do cromo trivalente em hexavalente ou vice versa. Em ambientes aquáticos onde concentração de oxigênio é baixa, a redução do cromo trivalente para hexavalente é favorecida,

sendo facilmente absorvido por seres constituintes do eco-sistema local (RICHARD e BOURG, 1991). Dessa forma pode-se notar que a alta densidade de estocagem possibilita que o cromo cause problemas de adaptação àquela condição.

A adição de cromo e as densidades de estocagem não provocaram alterações na estrutura histológica dos rins dos pacus. No tratamento C0D4 e no tratamento C18D20 os rins apresentavam estruturas e morfologia semelhantes entre si e similares ao descrito por GRIZZLE e ROGERS, (1985) e outros peixes ROBERTS (1981), composto pelos glomérulos e túbulos renais.

Segundo TAGLIARI *et al.* (2004), as alterações bioquímicas causadas pelo cromo como, por

exemplo, um estresse oxidativo é mais rápido do que a alteração morfológica, desta forma, pode ser que o tempo de exposição possa não ser suficiente para provocar lesões nos rins de pacus do presente experimento.

Assim, o uso do cromo deve ser empregado em algumas fases do ciclo de cultivo, especialmente, para o cultivo de alevinos e jovens de peixes, sendo estes os períodos de maior atividade metabólica e, também de maior estresse de manejo. A alimentação contínua por mais de 90 dias se torna desfavorável para a saúde dos peixes, assim o cromo nos níveis de 12 e 18 mg de cromo/kg de ração devem ser utilizados com rigor e estrategicamente, em algumas fases do ciclo e não continuamente.

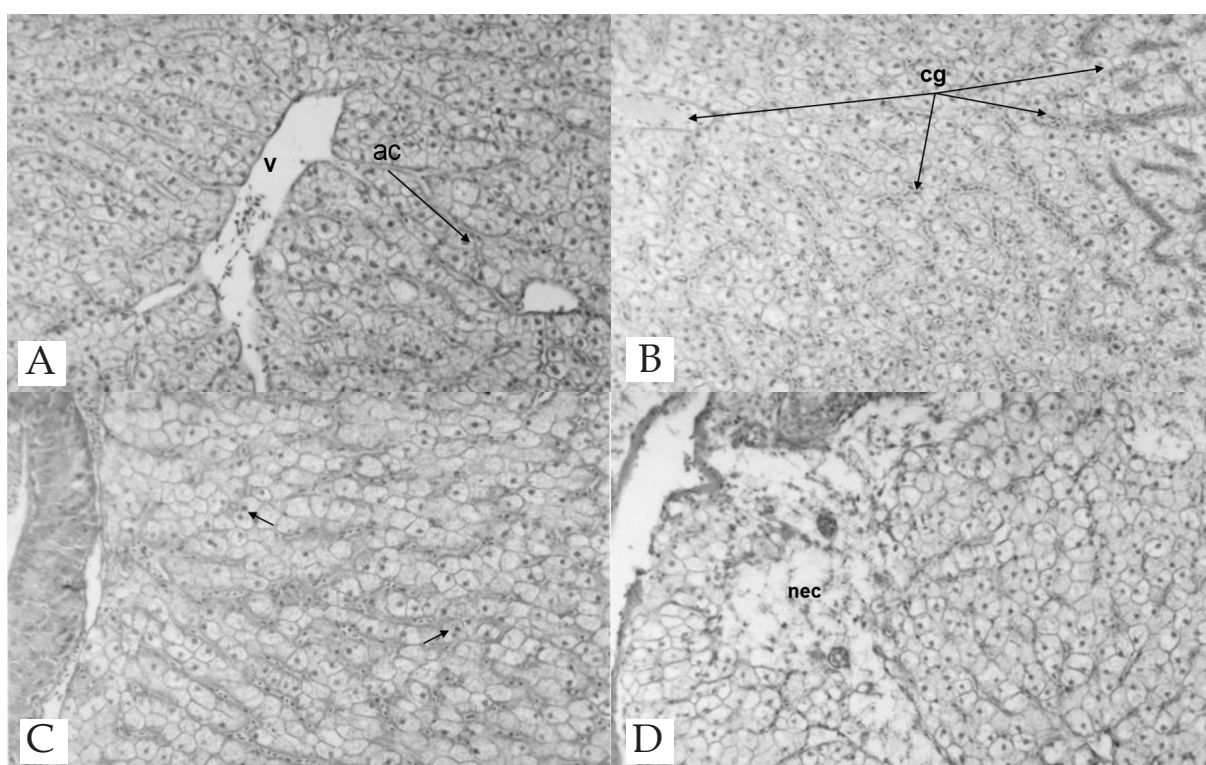


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de pacus jovens: **A)** Detalhe do fígado sem alterações histopatológicas, onde se observa arranjo cordonal dos hepatócitos (Ac), veia central (v). Tratamento 0 mg/kg de cromo em qualquer densidade de estocagem. HE. 200x. **B)** Presença congestão sangüínea (cg) no fígado. Tratamento com 6 mg de cromo/kg na maior densidade de estocagem. HE. 200x. **C)** Ocorrência de fusão celular dos hepatócitos (seta) e aumento do volume celular com deslocamento do núcleo para periferia (N) no fígado. Tratamento com 18 mg de cromo/kg na menor densidade de estocagem. HE. 200x. **D)** Detalhe da ocorrência de necrose (nec), desarranjo da estrutura cordonal (traço). Tratamento com 18 mg de cromo/kg na maior densidade de estocagem. HE. 200x

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIF, M.; KHAN, A.R.; SOK, K.; MIN HUSSAIN Z, MAAL-ABRAR, KHAN M. 2002 Textile effluents and their contribution towards aquatic pollution

in the Kabul River. *J. Society. Pakistan*, Islamabad, 24(2): 106-111.

ANDERSON, R.A. 1981 Nutritional role of chromium. *Scientific Total Environm*, {sl}, 17: 13-29.

- ANDERSON, R.A. 1994 Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. *Biotechnology in the feed industry, proceedings of Alltech' 10 th Annual symposium*, Nottingham. p.267-74
- BEG, M.U. AL-MUZAINI, S. SAEED, T. JACOB, P.G. BEG, K.R. AL-BAHLOUL, M. AL-MATROUK, K. AL-OBAID, TKURIAN, A. 2001 Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in kuwait. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, 41: 289-297.
- BEHMER, O.A., TOLOSA, E.M.C., FREITAS NETO, A.G. 1976 *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Ed. EDART. 1ª Edição. São Paulo, 241p.
- BERNER, T.O., MURPHY, M.M., SLESINSKI, R. 2004 Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to food as a nutrient supplement. *Food and Chem. Toxicol.*, Oxford, 42: 1029-1042.
- CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 1986 RESOLUÇÃO CONAMA. n. 20, junho/1986. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986. Publicado no DOU de 30/07/86. Brasília-DF.
- DE FLORA, S. 2000 Threshold mechanism and site specificity in chromium VI carcinogenesis. *Carcinogenesis*, Oxford, 21(4): 533-41.
- FAST, M.D.; SIMS, D.E.; BURKA, J.F.; MUSTAFA, A.; ROSS, N.W. 2002 Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, part A, New York, 132: 645-57.
- FLETCHER, T.C. 1978 Defense mechanism in fish. In: *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. v. IV. Eds. MALINS, D.C. e SARGENT, J.R. Academic press. London, 189-222.
- GRIZZLE, J.M., ROGERS, W.A. 1985 *Anatomy and Histology of the Channel Catfish*, ed Auburn University, Auburn, Alabama, 94p.
- HASTEN, D. L.; HEGSTED, M.H.; KEENAN, M.J.; MORRIS, G.S. 1997 Effects of various forms of dietary chromium on growth and body composition in the rat. *Nutrition research*, Tarrytown, 17(2): 283-94.
- HERTZ, Y., MADAR, Z., HEPHER, B., GERTLER, A. 1989 Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture*, Amsterdam, 76: 255-67.
- HOSSAIN S.M., BARRETO, S.B., SILVA, C.G. 1998 Growth performance and carcass composition of broilers fed supplemental chromium from chromium yeast. *Animal Feed Science Technology*, New York, 71: 217-28.
- INSTITUTE OF MEDICINE. 2003 *Dietary references intake for vitamin A, K, Arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc*. National Academic Press, Washington, 2003. 800p.
- IPCS-International Programme on Chemical Safety World Health organization. 1988 *Geneva*
- JORDÃO, C.P.; PEREIRA, M.G.; PEREIRA, J.L. 2002 Metal contamination of riverwaters and sediments from effluents of kaolin processing in Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution*, Dordrecht, 140: 119-138.
- LEE, T.H.; HWANG, P.P.; LIN, H.C. 1996 Morphological changes of integumental chloride cells to ambient cadmium during the earling development of teleost, *Oreochromis niloticus*. *Environ. Bios. Fish*, Dordrecht, 45: 95-102.
- MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M.; TORT, L. 1999 Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjects to crowding stress. *Aquaculture*, Amsterdam, 171: 269-78.
- MORDENTI, A., PIVA, A., PIVA, G. 1997 The european perspective on organic chromium in animal nutrition. *Biotechnology in the feed industry, proceedings of Alltech' 13 th Annual symposium*, Nottingham, p227-40.
- PAN, Q.; LIU, S.; TAN, Y.; BI, Y. 2003 The effects of chromium piccolinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 225: 421-29.
- PAPOUTSOGLU, S.E.; TZIHA, G.; VRETTOS, X.; ATHANASIOU, A. 1998 Effects of stocking density on behaviour and growth rate of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed recirculated system. *Aquacultural Engineering*, Essex, 18: 138-144.

- RICHARD, F.C., BOURG, A.C.M. 1991 Aqueous geochemistry of chromium: a review. *Water resources*, New York, 25(7): 807-16.
- ROBERTS, R.J. 1981 *Patologia de los peces*. Ed. ediciones mundi prensa, Madri, 366p.
- ROBERTS, A.P. e ORIS, J.T. 2004 Multiple biomarkers responses in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, New York, 138: 221-228.
- ROTHLAND, J.; PAVLIDIS, M.; KENTOURI, M.; ABAD, M.E.; TORT, L. 1997 Non-specific immune responses in the red porgy *pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, Amsterdam, 156: 279-90.
- SHIAU, S.Y. e LIANG, H.S. 1995 Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) are effected by chromium oxide inclusion in the diet. *J. Nutrition*, Philadelphia, 125: 976-82.
- SOUZA, V.L.; LUNARDI, L.O.; VASQUES, L.H.; CASALETTI, L.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C. 2001 Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. *Bras. J. Morphol. Sci.*, São Paulo, 18(1): 15-20.
- TAGLIARI, K.C.; VARGAS, V.M.F.; ZIMIANI, K.; CECCHINI, R. 2004 Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Amsterdam, 17: 148-57.
- TORT, L., SUNYER, E.G., MOLINERO, A. 1996 Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, 51: 179-88.
- USEPA 2005 Environmental protection agency. Occurrence Estimation Methodology and Occurrence Findings Report for the Six-Year Regulatory Review of Existing National Primary Drinking Water Regulations 12-20-2005. Washington. Disponível em: www.epa.gov. Acesso em: 01 mar. 06.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1986. *Chromium*. Geneva, 1: 91-111.