UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARIA AMÁLIA DA SILVA

Ensaios de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Piracicaba
2013

MARIA AMÁLIA DA SILVA

Ensaios de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ferreira

Piracicaba
2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Maria Amália da

Ensaios de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Maria Amália da Silva; orientador José Roberto Ferreira. - - Piracicaba, 2013.

124 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aquicultura de água doce 2. Biodisponibilidade 3. Cádmio 4. Cobre 5. Ecotoxicologia 6. Espectrometria de massas 7. Metais 8. Toxicologia ambiental I. Título

CDU (574.64 + 546.48/.56) : 597.556.33

DEDICATÓRIA

Á Deus por mais uma conquista alcançada!

Dedico aos meus pais,
Paulo Roberto da Silva e Cinira Ap. Camolezi da Silva,
por todo carinho, amor, apoio e incentivo.

Ao meu noivo Rafael, pelo companheirismo, amor, compreensão, apoio e torcida para mais uma conquista.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Ferreira pela orientação, ensinamentos, compreensão e amizade em todos os momentos;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências, pela oportunidade oferecida e ensinamentos adquiridos;

Ao Centro de Estudos Ambientais (CEA) pelo espaço cedido para a realização das atividades experimentais deste trabalho;

Aos meus irmãos Marcelo e Margareth por toda a amizade, carinho e palavras de apoio;

Aos meus sogros Ademir e Rosane pela torcida para mais uma conquista em minha vida;

Aos técnicos e amigos do CENA e CEA, Valdemir, Sheila, Fátima, Tatinha, Francisca e Amanda pela amizade, dedicação, atenção, carinho, ensino e descontração;

Ao docente e pesquisador Prof. Dr. Elias A. G. Zagatto pela infraestrutura oferecida e diálogos construtivos;

Aos amigos e colegas do laboratório de Química Analítica, pela amizade, conversas descontraídas, ensinamentos, auxílios e por todos os momentos que passamos juntos;

Aos estagiários Thiago e Diogo por toda a dedicação oferecida para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade construída;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida;

Ao Prof. Dr. Amauri Antônio Menegário pela amizade, ensinamentos e pelo espaço oferecido para a realização deste trabalho;

Ao Alfredo, pela amizade, conversas, descontrações e caronas a Rio Claro;

A Marília por todo carinho, amizade, atenção, dedicação e auxílio oferecido;

Aos membros da banca de defesa de mestrado pela disponibilidade;

À Vanda e a Fabiana por toda a amizade, carinho, apoio, momentos de descontração e conversas.

A todos os que torceram por mim para mais uma conquista em minha vida.

Muito obrigada!!!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

RESUMO

SILVA, M. A. **Ensaios de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2013. 124 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Este estudo teve por objetivos conhecer aspectos da toxicidade de Cu e Cd, separadamente e em combinação (Cu+Cd) em tilápias (*Oreochromis niloticus*), verificando possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos. Determinou-se nessas situações, a bioacumulação dos metais no tecido muscular, brânquias e fígado dos espécimes, ênfase ao potencial bioindicador da espécie. Para tanto, ensaios de toxicidade aguda na forma estática foram conduzidos por um período de 96 horas. Previamente a esses, foram realizados testes preliminares com as referidas espécies químicas em concentrações logarítmicas, com o intuito de se determinar os intervalos onde 100% de mortalidade e 100% de sobrevivência eram observados para a espécie. Através desta etapa estabeleceram-se para os ensaios de toxicidade aguda, as concentrações de 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg L^{-1} para Cu e Cu+Cd e de 0,0, 1,0, 5,0, 10,0, 25,0 e 50,0 mg L^{-1} para Cd. As variáveis temperatura, pH, amônia, oxigênio dissolvido e metais dissolvidos foram aferidas no início e a cada 24 horas. A dureza total foi monitorada apenas para os tratamentos controle, no início e término dos experimentos para fins de verificar a qualidade da água. Para os ensaios crônicos, conduzidos na forma semi-estática e com duração de 21 dias, duas concentrações de cada metal foram utilizadas, onde o critério de estabelecimento dos valores foi a $CL_{50}/10$ e a média dos logaritmos das $CL_{50}/10$ e $CL_{50}/100$. Amostragens para verificação da bioacumulação foram realizadas em 24 e 96 horas, 07, 14 e 21 dias, sendo que durante essas amostragens, as variáveis pH, temperatura, oxigênio dissolvido, amônia e teores de metais nas soluções foram determinadas. Como nos ensaios anteriores, a dureza total foi determinada no primeiro e último dia para controle de qualidade da água. As $CL_{50\text{-}96h}$ para o cobre, cádmio e cobre+cádmio foram respectivamente 3,53 mg L^{-1}, 20,13 mg L^{-1} e 1,36 mg L^{-1} Pode-se observar durante os ensaios preliminar e agudo, uma acentuada precipitação do Cu principalmente nas maiores concentrações, isso em decorrência do produto de solubilidade do hidróxido de cobre formado nas cubas experimentais.

Nessas concentrações, observou-se que o Cd apresentou redução quando em combinação, atribuído à co-precipitação ocorrida com o Cu. No que diz respeito à bioacumulação dos metais nos órgãos e tecidos, pode-se observar, com algumas exceções, que o fígado, devido às suas funções metabólicas, apresentou uma maior acumulação, seguido das brânquias e tecido muscular. A tilápia apresentou maior resistência ao $CdCl_2.H_2O$ do que ao $CuCl_2$ tendo a combinação das duas espécies químicas potencializado a toxicidade de forma sinérgica. Esse estudo possibilitou concluir que a aferição das concentrações efetivas dos elementos de interesse durante ensaios de toxicidade é de relevante importância, pois a concentração esperada para as espécies químicas dissolvidas podem diferir daquelas esperadas, em função do elemento analisado e do tempo de duração do experimento.

Palavras-chaves: *Oreochromis niloticus*. Cádmio. Cobre. Sinergismo. CL_{50}.

ABSTRACT

SILVA, M. A. **Acute and chronic toxicity tests with Cd, Cu and (Cd + Cu) on the Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*).** 2013. 124p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The aim of this work was to assess for the toxicity of Cu and Cd, separately and in combination (Cu+Cd) in tilapias (*Oreochromis niloticus*), checking for the possible synergical or antagonic effects. In these situations, the bioaccumulation of metals in muscle tissue, gill and liver were determinated, emphasizing the potential bioindicator of the specie. Acute toxicity test in static mode were carried out for a period of 96 hours. Prior to these, preliminary tests were performed with such chemical species in logarithmic concentration, in order to establish the range of concentrations in which 100% mortality and 100% survival were observed for the specie. Through this step, concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg L^{-1} for Cu and Cu+Cd and of 0.0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 and 50.0 mgL^{-1} for Cd were defined in acute toxicity assays. Temperature, pH, ammonia, dissolved oxygen and dissolved metals were measured at the beginning and every 24 hours. Total hardness was monitored only for the control treatments, in the beginning and at the end of the experiments to check the water quality. Semi-static chronic assays, were conducted during 21 days, by using two concentrations of each metal. Concentrations were calculated as $CL_{50}/10$ and average of logarithms of $CL_{50}/10$ and $CL_{50}/100$. Samplings for assessing the metals bioaccumulation were performed at 24 and 96 hours, 07, 14 and 21 days. In a mean time, pH, temperature, dissolved oxygen, ammonia and dissolved metals were also determinated. Like in previous assays, total hardness was determined in the first and in the last day. The LC_{50} for copper, cadmium and copper+cadmium were respectively 3.53 mg L^{-1}, 20.13 mg L^{-1} and 1.36 mg L^{-1}. A precipitation of copper hydroxide, moreover for the higher concentrations were observed in both, preliminary and acute assays. On these situations, Cd concentration was decreased when combined, assigned to the co-precipitation occurred with Cu. Liver, due to it metabolic functions, showed higher metals accumulation, followed by gills and musclular tissue. It can be concluded that tilapia showed greater resistance to $CdCl_2.H_2O$, than to $CuCl_2$ and with the combination of the two chemical species, potentiated the toxicity of synergic form. This study also enabled to conclud that measurement of effective concentrations of the elements of interest during test of toxicity is relevant, because the concentrations obtained may differ to those expected, according to the element and the duration of the experiment.

Keywords: *Oreochromis niloticus*. Cadmium. Copper. Synergism, LC_{50}.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Organismo Teste: *Oreochromis niloticus* 27

Figura 2 Acomodação das embalagens plásticas contendo os organismos-testes em veículo que efetua o transporte do lote de alevinos até tanque de aclimatação, no laboratório do CEA/UNESP, Rio Claro 41

Figura 3 Caixas d'água de 500 litros preparadas com água desclorada para a aclimatação dos organismos-teste 41

Figura 4 Reservatórios de 1000 litros, interno e externo a sala, utilizados no processo de descloração da água proveniente da rede de abastecimento.....42

Figura 5 Sequência do procedimento e equalização da temperatura da água contida na embalagem plástica com a temperatura da caixa d'água de aclimatação (A); adaptação do meio abiótico (B) e liberação dos peixes com auxílio de uma rede(C).....43

Figura 6 Filtro biológico tipo "Dry-Wet" utilizado para o processo de filtragem das duas caixas d'água de aclimatação 44

Figura 7 Cubas plásticas com telas na superfície, utilizadas nos ensaios de toxicidade com cobre, cádmio e cobre+cádmio 45

Figura 8 Determinação da biomassa dos organismos-teste anteriormente a adição dos metais nas cubas experimentais (A) e introdução dos organismos-teste nos aquários posteriormente a adição e homogeneização das soluções(B).....46

Figura 9 Determinação das variáveis pH, temperatura e OD através da utilização da sonda YSI Incorporated 556 MPS.....48

Figura 10 Processo de manutenção diária das cubas experimentais através de sifonamento para retirada das fezes e outros resíduos acumulados no fundo dos aquários 49

Figura 11 Fígado (A), Brânquias (B) e tecido muscular (C) retirados dos organismos-teste 49

Figura 12 Dissecação dos organismos-teste, indicando a retirada do fígado, das brânquias e amostras do tecido muscular (A) e (B), e acondicionamento dos órgãos retirados em pequenos sacos plásticos para posterior preparo de amostras e determinação da bioconcentração dos metais (C) 50

Figura 13 Procedimento de sacrifício dos organismos-teste sobreviventes após completado o período de 48 horas do ensaio preliminar (A); Peixes acondicionados no interior de sacos plásticos devidamente etiquetados para armazenagem em congelador para futura dissecação (B) 51

Figura 14 Vista da unidade experimental contendo 10 organismos-testes (*Oreochromis niloticus*) em aquário contendo 40 litros de solução 52

Figura 15 Coleta e armazenamento dos efluentes gerados nos experimentos para posterior tratamentos.....59

Figura 16 Efluentes em tambores plásticos para o processo de evaporação. Etapa inicial do processo de tratamento dos efluentes.....59

Figura 17 Frascos de Teflon utilizados no processo de digestão das amostras de fígado, brânquias e tecidos musculares dos ensaios preliminar, agudo e crônico de Cu, Cd e Cu+Cd.....61

Figura 18 Espécimes de tilápias, expostas a cobre e cádmio, na interface água-atmosfera em busca de oxigênio.....65

Figura 19 Leve expansão do lábio inferior observado em *Oreochromis niloticus* expostos aos metais cobre e cádmio no decorrer dos períodos experimentais.....66

Figura 20 Contorno avermelhado do lábio de *Oreochromis niloticus* expostos a altas concentrações de cobre+cádmio.....67

Figura 21 % de óbitos em tilápias (*Oreochromis niloticus*), em um período de 48 horas para os testes preliminares com as solução de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....68

Figura 22 Variação da concentração de cobre (mg L^{-1} Cu) presente na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com $CuCl_2$ durante ensaio preliminar.....72

Figura 23 Variação da concentração de cádmio (mg L^{-1} Cd) presente na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com $CdCl_2.H_2O$ durante ensaio preliminar.....72

Figura 24 Variação das concentrações de cobre e cádmio (mg L^{-1} Cu+Cd) presentes na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com esses sais durante ensaio preliminar.....73

Figura 25 Fotografia ilustrativa do precipitado de cobre formado nas cubas experimentais, nas concentrações de 10 e 100 mg L^{-1} Cu e 10 e 100 mg L^{-1} Cu + Cd, durante o ensaio preliminar. Na situação com a presença simultânea dos dois metais, constatou-se a ocorrência de co-precipitação de Cd, induzida pelo Cu.....74

Figura 26 Mortalidade (%) dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*, considerando o período experimental de 96 horas, em função da concentração do metal no teste agudo com $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....75

Figura 27 Mortalidade (%) dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*, considerando o período experimental de 96 horas, em função da concentração do metal no teste agudo com $CdCl_2.H_2O$.....76

Figura 28 $CL_{50\text{-}96h}$ (mg L^{-1}) para cobre, calculada através do ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre ($CuCl_2$).....78

Figura 29 $CL_{50\text{-}96h}$ (mg L^{-1}) para o cádmio, relativa ao ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$).....78

Figura 30 CL_{50-96h} (mg L^{-1}) para a mistura dos metais cobre+cádmio estimada através do ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre ($CuCl_2$) + cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$).....79

Figura 31 Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CuCl_2$.....83

Figura 32 Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CdCl_2.H_2O$.....84

Figura 33 Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$.....84

Figura 34 Concentração (mg L^{-1}) obtida de cobre ($CuCl_2$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre.....86

Figura 35 Concentração (mg L^{-1}) obtida de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cádmio.....87

Figura 36 Concentração (mg L^{-1}) obtida de cobre ($CuCl_2$) e cádmio ($CdCl_2.H_2O$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre + cloreto de cádmio.....87

Figura 37 Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) aferida durante os períodos de amostragens de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias para o ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....90

Figura 38 Concentrações de cobre dissolvido (mg L^{-1} Cu) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CuCl_2$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio.....92

Figura 39 Concentrações de cádmio dissolvido (mg L^{-1} Cd) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CdCl_2.H_2O$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio.....92

Figura 40 Concentrações de cobre e cádmio dissolvidos (mg L^{-1} Cu+Cd) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio.....93

Figura 41 Teores de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0 mg L^{-1} Cu durante 48 horas (ensaio preliminar).....95

Figura 42 Teores de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0 mg L^{-1} Cd durante 48 horas (ensaio preliminar).....96

Figura 43 Teores de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 10 e 100,0 mg L^{-1} Cu+Cd durante 48 horas (ensaio preliminar).....96

Figura 44 Bioconcentração de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápia do Nilo expostas a soluções de 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg L^{-1} Cu, durante 96 horas (ensaio agudo).....99

Figura 45 Bioconcentração de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas a soluções de 0,0, 1,0, 5,0, 10,0 25,0 e 50,0 mg L^{-1} Cd durante 96 horas (ensaio agudo).....100

Figura 46 Bioconcentração de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápia do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg L^{-1} Cu+Cd, durante 96 horas (ensaio agudo).....100

Figura 47 Níveis de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cobre em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias.....104

Figura 48 Níveis de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cádmio em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias.....105

Figura 49 Níveis de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cobre + cloreto de cádmio em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Relação massa/volume (g L^{-1}) média, relativa aos cinco organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente aos ensaios preliminares de soluções $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ compreendidas entre 0,0 e 100,0 mg L^{-1}.....47

Tabela 2 Relação massa/volume (g L^{-1}) média relativa aos dez organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente aos ensaios definitivos de soluções $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ compreendidas entre 0,0 e 10,0 mg L^{1}.....53

Tabela 3 Relação massa/volume (g L^{-1}) media relativa aos dez organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente ao ensaio definitivo de $CdCl_2.H_2O$ compreendidas entre 0,0 e 50,0 mg L^{-1}.....54

Tabela 4 Relação massa/volume (g L^{-1}) relativa aos quinze organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente ao ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$, $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....56

Tabela 5 Programação utilizada para o processo de digestão das amostras dos ensaios preliminares e definitivos de Cu, Cd e Cu+Cd.....62

Tabela 6 Programação utilizada para o processo de digestão das amostras dos ensaios crônicos com Cu, Cd e Cu+Cd.....62

Tabela 7 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CuCl_2$.....69

Tabela 8 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CdCl_2.H_2O$.....70

Tabela 9 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....70

Tabela 10 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CuCl_2$.....81

Tabela 11 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CdCl_2.H_2O$.....82

Tabela 12 Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$.....82

Tabela 13 Intervalo de valores registrados para as variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), nas concentrações testadas, monitoradas durante as amostragens de 0, 24 e 96 horas, 07, 14 e 21 dias do ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.....89

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 18
2.1. Testes ecotoxicológicos 20
2.2. Testes de toxicidade aguda 22
2.3. Testes de toxicidade crônica 24
2.4. Peixes como bioindicadores da qualidade da água 26
2.5. Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) 27
2.6. Fatores que influenciam na toxicidade 30
2.7. Toxicidade dos metais 33
2.7.1. Cobre 33
2.7.2. Cádmio 34
2.8. Bioacumulação 36
3. **OBJETIVOS** 39
3.1. Objetivo geral 39
3.2. Objetivos específicos 39
4. **MATERIAIS E MÉTODOS** 40
4.1. Organismos-teste 40
4.2. Aclimatação dos peixes 40
4.3. Ensaios preliminares com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$ 45
4.4. Ensaios agudos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$ 51
4.5. Ensaios crônicos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$ 55
4.6. Resíduos gerados 58
4.6.1. Peixes gerados 59
4.7. Preparo de amostras 60
4.7.1. Digestão das amostras em sistema pressurizado de microondas 61
4.8. Bioconcentração de cobre e cádmio 63

5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 64
5.1. Aspectos do comportamento dos organismos nos ensaios preliminar, agudo e crônico 64
5.2. Ensaio preliminar com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ 67
5.3. Ensaio agudo com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ 75
5.4. Ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ 89
5.5. Bioacumulação de cobre e cádmio nos tecidos e órgãos de *Oreochromis niloticus* 94
6. **CONCLUSÕES** 108
REFERÊNCIAS 109
ANEXOS 122

1. INTRODUÇÃO

O rápido e acentuado crescimento da população, o processo de urbanização, as atividades industriais e agrícolas e a exploração dos recursos naturais, têm como consequência a contaminação dos ecossistemas aquáticos, uma vez que estes são considerados recipientes finais de substâncias produzidas e liberadas no ambiente, tanto de forma natural ou antrópica (BRAYNER, 1998; BINEY et al., 1994; SPERLING, 1993).

Esse processo gera um estresse contínuo na natureza, com efeitos agudos ou crônicos à saúde dos ecossistemas e ao homem (BRAYNER, 1998; BINEY et al., 1994).

A magnitude desses efeitos sendo função da concentração e propriedades físicas e químicas dos compostos introduzidos, dos produtos finais de sua transformação, tempo de exposição, e características físicas e químicas do ambiente entre outras variáveis (COSTA et al., 2008).

Nesta gama de possibilidades, os metais tóxicos são de particular interesse, pois, podem alterar processos bioquímicos e fisiológicos, vitais ao metabolismo dos organismos (ATLI; CANLI, 2008).

Os metais são conhecidos como essenciais (Cr, Ni, Se, Fe, Zn, Cu, Mn, Co e Mo) e não essenciais (As, Sb, Hg, Pb, Cd, Tl, Ag, e Sn), onde no primeiro grupo encontram-se aqueles que desempenham papéis cruciais no metabolismo dos organismos, cujas quantidades de ótimo encontram-se em um estreito intervalo de concentrações. Ao contrário, os não essenciais não desempenham funções biológicas conhecidas e seus efeitos sobre a biota são considerados deletérios, mesmo em concentrações normalmente encontradas no ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Para ambos os grupos, quando introduzidos no sistema aquático, podem sofrer transformações químicas, as quais potencializam danos à saúde dos organismos expostos. Nessas condições, comprometimento da reprodução, alterações morfológicas, bioquímicas, histológicas e letalidade, podem ocorrer (SORENSEN, 1991; HEATH, 1995). Sendo assim, a realização de testes toxicológicos que avaliem o comportamento e as transformações dessas

substâncias químicas no ambiente e os seus possíveis efeitos sobre os organismos, tornam-se de utilidade (USEPA, 2002).

A aplicação desses testes na análise ambiental tem sido crescente, em acordo às transformações químicas no ambiente. É um instrumento de grande importância na busca do grau de toxicidade em diversos corpos hídricos e na detecção da capacidade de um agente tóxico em produzir efeitos deletérios aos organismos vivos, servindo, dessa forma, como uma potente ferramenta para mitigar os impactos antrópicos a que o ambiente está exposto (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Testes toxicológicos que utilizam peixes como organismos bioindicadores estão se tornando ferramentas promissoras na atualidade, por serem de importância para o auxílio na mitigação de efeitos causados à biota (HEATH, 1995). Essa classe de organismo apresenta alterações bioquímicas e fisiológicas características como respostas à exposição às substâncias químicas, constituindo-se dessa maneira, em bons bioindicadores para detectar possíveis problemas ambientais (BOMBAIL et al., 2001).

Uma vasta quantidade de estudos utilizando a espécie *Oreochromis niloticus* como bioindicadora em testes toxicológicos podem ser encontrados na literatura. Isso se deve principalmente às suas características como, fácil manipulação, adaptação ao cativeiro, manutenção em laboratório, sensibilidade à presença de poluentes, resistência a doenças, entre outras, que a qualifica como modelo biológico apropriado para essas finalidades (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007; WU; LIN; YANG, 2008; ALMEIDA et al., 2002).

Alguns contaminantes, dependendo de seu grau de resistência a degradação biótica e/ou abiótica, podem se acumular em tecidos e órgãos de organismos, ou ainda sofrer o processo conhecido como biomagnificação. Dessa maneira, o conhecimento das concentrações destes nos tecidos e órgãos dos organismos aquáticos, permite avaliar a que nível essa toxicidade se verifica, auxiliando de certa forma, a realizar uma redução nos impactos causados por esses poluentes na saúde dos ecossistemas aquáticos e consequentemente na saúde dos seres humanos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Testes toxicológicos

Testes toxicológicos são ensaios laboratoriais realizados em condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (água ou sedimento). Nesse contexto, organismos são expostos a diferentes concentrações da amostra e/ou xenobióticos, sendo em função da dose e tempo de exposição, observados e quantificados os efeitos tóxicos produzidos sobre estes (COSTA et al., 2008).

Os referidos ensaios possibilitam estabelecer limites permissíveis para diversas substâncias químicas e avaliar os impactos de poluentes sobre os organismos de um determinado ambiente (MOURA, 2009).

Os testes toxicológicos integram conceitos da ecologia, no que diz respeito à diversidade, representatividade e significado ecológico dos organismos, e conceitos da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A utilização desses testes torna-se cada dia mais importante para as avaliações dos impactos ambientais, informando o efeito tóxico que um xenobiótico pode causar em um ecossistema como um todo. (RODRIGUES, 2002).

Nessas avaliações, as informações geradas em programas de monitoramento, constituem-se em importante subsídio ao conhecimento global da área de estudo, pois informa a respeito da extensão da poluição, da deterioração ou da melhoria gerada; permitindo avaliar a eficiência de ações mitigadoras adotadas e normas ou guias que estejam em vigor, elaboradas com fins de proteção ambiental (RAYA-RODRIGUES, 2000).

Deste modo, testes toxicológicos são utilizados em rotina nos órgãos ambientais no âmbito do licenciamento e da fiscalização de atividades potencialmente causadoras de poluição, bem como do monitoramento da qualidade das águas, sendo mais aplicados em ações preventivas (KNIE; LOPES, 2004).

A padronização de ensaios toxicológicos foi iniciada no Brasil por Rocha et. al. em 1971, conforme descrito no relatório da FESB-CETESB[1], (1971 apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008, p. 10).

Um programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes foi desenvolvido em 1975, pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Para a realização desses ensaios utilizam-se organismos conhecidos como bioindicadores, que reagem à poluição com modificações de suas funções vitais normais, ou que são capazes de acumular poluentes, sendo dessa forma utilizados para avaliação da qualidade ambiental. Dentre esses organismos podem-se destacar algas, microcrustáceos e peixes, entre outros (RODRIGUES, 2002).

Um critério relevante no emprego dessas espécies é a sua disponibilidade, representatividade do ecossistema em estudos e sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, de maneira a possibilitar a obtenção de resultados precisos, exatos e reprodutíveis (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Os testes toxicológicos podem ser classificados em agudos e crônicos, diferindo basicamente entre si, na duração, concentração das espécies químicas e nas respostas finais medidas.

Segundo Lombardi (2004), os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, proporcionando rápidas respostas em estudos sobre efeitos tóxicos letais, em que o objetivo é determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) de certa substância sobre os organismos aquáticos, em um tempo de 24 a 96 horas de exposição, avaliando os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente analisado.

---

[1] FESB – CETESB. *Estudos efetuados na represa de Americana e no trecho do Rio Atibaia, a montante do reservatório*. Relatório Técnico. São Paulo. 67p. 1971.

O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos em testes de toxidade aguda não indica que ela não seja tóxica para estes (COSTA et al., 2008), sendo que uma exposição ao agente estressor, em níveis subletais, pode não levar a morte do organismo, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais. Estes efeitos não são detectados em testes de toxicidade aguda, necessitando de ensaios de toxicidade crônica, os quais avaliam os efeitos de substâncias químicas sobre espécies por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Quanto à dinâmica, os testes podem ainda ser classificados de acordo com Costa et al. (2008) em estáticos, semi-estáticos e de fluxo contínuo.

No sistema estático os organismos são expostos à mesma solução durante todo o período de ensaio. Este se aplica a testes de curta duração e com substâncias não voláteis ou pouco degradáveis. No sistema semi-estático, em geral, há a troca periódica e parcial (~25% do volume) dessas soluções através da sua substituição nos recipientes que encerram o ambiente experimental e nos sistemas em fluxo contínuo, as soluções testes fluem continuamente, sendo recomendados em testes de longa duração.

Os testes ecotoxicológicos com todas as possibilidades que encerram na mensuração da poluição ambiental, permitem ainda desenvolver estudos científicos que definam a capacidade de assimilação do meio, a compreensão dos processos naturais, os efeitos dos poluentes sobre o homem e aos ecossistemas, bem como os efeitos sinérgicos e cumulativos de diferentes poluentes (SÁNCHEZ, 2006).

2.2. Testes de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda é usado com o objetivo de estabelecer a concentração de um determinando contaminante que produz efeitos danosos a um organismo, por meio de um curto tempo de exposição e que resulta em danos biológicos severos ou a morte destes (PANKRATZ, 2001). Esses efeitos tóxicos

estão relacionados com a concentração do contaminante no ambiente e com o período de exposição dos organismos.

Estes testes avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos a um estímulo que se manifesta, em geral, em um intervalo de 0 a 96 horas. Normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação que a antecede, como o estado de imobilidade em invertebrados (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Ensaios de toxicidade aguda têm como resultado as concentrações letais médias (CL_{50}) ocorridas em um curto período de tempo, disponibilizando dessa maneira, informações para estudos futuros e mais criteriosos como testes de toxicidade crônica e avaliação de risco ecotoxicológicos (LOMBARDI, 2012).

Estudos com essas finalidades, utilizando peixes como organismos-testes, vêm sendo desenvolvidos a fim de obter uma resposta ampla dos efeitos tóxicos de várias substâncias.

Para o caso das espécies químicas empregadas nesta pesquisa, pode-se mencionar alguns estudos, como descrito abaixo.

Boock e Machado Neto (2005) avaliaram a toxicidade aguda do oxicloreto de cobre na espécie *Poecilia reticulata*. Estes autores expuseram os organismos a concentrações crescentes do fungicida por 96 horas, obtendo um valor para a CL_{50} de 0,1 mg L^{-1} de oxicloreto de cobre, correspondendo a 0,06 mg de cobre metálico/litro. Os autores também observaram, através de um teste de bioacumulação, que ocorreu um acúmulo de cobre na espécie, sendo que uma eliminação total do metal se deu apenas na menor concentração exposta.

Gomes et al. (2009) estimaram a CL_{50} de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) e cádmio ($CdCl_2.H_2O$) para piauçu, *Leporinus macrocephalus* e curimatã *Prochilodus vimboides*. Os autores encontraram os valores de 0,047 e 0,090 mg L^{-1} para o cobre e 3,16 e 7,42 mg L^{-1} para o cádmio para curimatã e piauçu, respectivamente. Os mesmos concluíram que entre as duas espécies avaliadas, o curimatã se mostrou mais adequado para estudos toxicológicos da bacia do rio Doce devido a sua alta sensibilidade aos metais.

Lam et al. (1998) determinaram a concentração letal média dos metais cobre e zinco, assim como avaliaram a expressão gênica de metalotioneínas em fígado e guelras de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e tilápias (*Tilapia mossambica*) através da exposição dessas a concentrações subletais por três semanas. Os autores concluíram que níveis de metalotioneínas em carpa comum não é um biomarcador

apropriado para o monitoramento da poluição ambiental, enquanto que em tilápias esta mostrou uma melhor sensibilidade no monitoramento da contaminação por metais.

De uma forma geral, os testes agudos são baratos, confiáveis e simples de desenvolver, porém existem algumas limitações, tais como: não avaliam a maneira como a mortalidade aumenta após a exposição, uma vez que esses testes são de curta duração; utiliza-se apenas uma espécie e um estágio de vida; varia na sensibilidade dos organismos a um poluente e é insensível a efeitos subletais que possam levar a morte por exposição prolongada (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Amostras de muitas localidades não produzem ou produzem apenas efeitos marginais em testes de toxicidade aguda, não revelando assim a relação fundamental entre a concentração e o efeito, que é crucial para a avaliação da toxicidade. No entanto, as condições locais podem atribuir certos aspectos de instabilidade em longo prazo ao ecossistema. Deste modo, testes de toxicidade crônica são fundamentais para avaliar a ação dos poluentes nos organismos em um período mais prolongado (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

2.3. Testes de toxicidade crônica

No ambiente aquático, em geral, os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes que, embora não os levando necessariamente ao óbito, pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo. Esses efeitos não são detectados em testes de toxicidade aguda, sendo necessário o uso de ensaios de toxicidade crônica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Ensaios crônicos permitem avaliar os possíveis efeitos indiretos causados pelas substâncias químicas como, por exemplo, alterações na sobrevivência dos organismos, nas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, no comportamento, modificações fisiológicas, bioquímicas e histológicas, dentre outras (BURTON; MACPHERSON, 1995).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como CENO ou CEO, que são respectivamente, a maior concentração do

agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos e a menor concentração do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos (COSTA et al., 2008).

Em ambientes aquáticos a ocorrência dos efeitos crônicos é mais frequente, devido à diluição pontual e dispersa dos xenobióticos oriundos das águas de contribuição, às relações antagonistas entre as substâncias, à rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e à sedimentação de sólidos em suspensão. Dessa forma, os organismos são expostos à baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo, ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e até mesmo letais ao longo do tempo (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Estudos com objetivo de determinar os possíveis efeitos adversos de muitos xenobióticos em condições prolongadas de exposição a concentrações subletais, utilizando peixes como espécies bioindicadores vêm sendo desenvolvidos. Entre esses se pode citar Dias et al. (2007) que verificaram os efeitos tóxicos do cloreto de mercúrio em concentrações subletais sobre o quadro histológico de *Oreochromis niloticus*, analisando o baço, coração e encéfalo dos organismos. Os autores observaram alterações como hiperplasia e hipertrofia dos centros de melanomacrófagos no baço, enquanto que no coração e encéfalo as alterações histológicas observadas não forem relevantes.

Flores-Lopes e Malabarba (2007) avaliaram através de análises histológicas, algumas alterações ocorridas no fígado de Lambarí (*Astyanax jacuhiensis)* provenientes das lagoas de estabilização do Sistema Integrado de Tratamento dos Efluentes Líquidos, que é responsável pelo tratamento dos efluentes gerados pelo Polo Petroquímico do Sul, em três períodos de amostragem (janeiro e abril de 1999 e outubro de 2002). Os autores verificaram que as alterações histopatológicas no fígado dos organismos eram de intensidade leve a moderada, concluindo assim certa eficácia do sistema de tratamento de efluentes líquidos.

Almeida et al. (2001) analisaram o impacto sob o metabolismo de *Oreochromis niloticus* devido a uma exposição de cádmio ($CdCl_2$) a doses subletais por 7 dias. Os autores concluíram que essa exposição induziu a alterações metabólicas na espécie estudada, tais como: aumento da glicólise do músculo vermelho e redução de proteínas e glicólise no músculo branco.

Atli e Canli (2008) determinaram os níveis de metalotioneínas (Mts) nos tecidos de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações subletais de Cd ($CdCl_2.H_2O$), Cu ($CuCl_2.2H_2O$), Zn ($ZnCl_2$) e Pb ($Pb(NO_3)_2$) por um período de 14 dias. Os autores verificaram através deste estudo que níveis de metalotioneínas no fígado aumentaram apenas durante a exposição ao cádmio, indicando que este é o principal indutor dessas proteínas no órgão estudado.

Segundo Terra e Feiden (2003) a expressão de muitos agressores ambientais somente torna-se visível quando estão presentes em altas doses. Entretanto, quando eles existem em porções menores, seus efeitos na bagagem genética dos indivíduos interferem nas suas funções fisiológicas, altera a frequência reprodutiva e/ou a qualidade e quantidade de organismos gerados.

Sendo assim, a realização de testes de toxicidade crônica ao mesmo tempo em que completa o teste de toxicidade aguda, fornece informações a respeito da sensibilidade e dos efeitos adversos nos organismos, expostos durante um longo período a diversos agentes tóxicos presentes em baixas concentrações no ambiente.

2.4. Peixes como bioindicadores da qualidade da água

A estruturação física, química e dinâmica dos ecossistemas aquáticos vem sendo alteradas de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais. Estes provêm de atividades antrópicas e acarretam queda da qualidade da água, com possível perda de biodiversidade aquática (GOULART; CALLISTO, 2003).

Para melhorar os programas de avaliação desses impactos nesses ambientes, faz-se necessária a utilização de organismos bioindicadores como representantes da biota (NAIGAGA et al., 2011).

Os peixes, por fazerem parte da dieta em muitos países e, em outros comporem a principal fonte de proteínas, (SILVA FILHO et al., 2000), constituem-se bons bioindicadores dos efeitos de poluentes. Devido à sua sensibilidade diferencial à poluição, eles estão sendo, cada vez mais, utilizados para detectar possíveis problemas ambientais (BOMBAIL et al., 2001).

Esses organismos apresentam várias respostas bioquímicas e fisiológicas frente aos xenobióticos que podem resultar na adaptação ao poluente ou induzir efeitos negativos na sobrevivência e em suas condições fisiológicas (DE SMET; BLUST, 2001; BEGUM, 2004).

Ensaios utilizando os peixes como espécies bioindicadoras permitem avaliar parâmetros como mortalidade, alterações comportamentais, bioacumulação e danos a tecidos e células. Esses efeitos auxiliam estimar de uma forma mais aprofundada a estabilidade do ecossistema aquático (OLIVEIRA-RIBEIRO; GUIMARÃES; PFEIFFER, 1996).

Considerados padrão em testes de toxicidade aguda e crônica, a utilização desses organismos tem sua importância ecológica e econômica, uma vez que ocupam níveis tróficos elevados, acumulando altos teores de contaminantes através da biomagnificação e são considerados parte da dieta alimentar para o homem (REYNOLDSON; DAY, 1993).

2.5. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Figura 1 - Organismo Teste: *Oreochromis niloticus*

A Tilápia do Nilo ocupa a seguinte posição sistemática de acordo com LINNAEUS,1758: Reino: Animalia; Filo: Chordata; Classe: Osteichthyes; Ordem: Perciformes; Família: Cichlidae; Subfamília: Pseudocrenilabrinae; Gênero: *Oreochromis*; Espécie: *niloticus*.

A primeira espécie de tilápia introduzida no Brasil foi à tilápia-do-congo (*Tilápia rendalli*) que chegou ao estado de São Paulo em 1953. Em 1971 foram importados pelo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a Tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornoru*m) introduzidas no nordeste brasileiro, originária da Costa do Marfim, África Ocidental (LOVSHIN, 2000).

A tilápia é um peixe encontrado em quase todo o país, tanto em cultivos comerciais como em reservatórios e açudes, sendo que entre as diversas espécies de tilápias utilizadas na piscicultura, a do Nilo (*Oreochromis niloticus*), tem sido a mais cultivada, tornando-se assim a espécie mais popular no Brasil (HILSDORF, 2011). Possui grande potencial industrial e tem demonstrado boa adaptação às condições climáticas brasileiras. A alta qualidade de sua carne faz da tilápia um produto de grande interesse para o processamento industrial e com boa aceitação pelo mercado consumidor (DIAS et al., 2007). Esta espécie apresenta distribuição geográfica restrita a regiões com temperatura mínima de até 20,0º C, sendo que quando corretamente aclimatada, pode ser cultivada em temperatura de até 14,0ºC, suportando temperaturas mínimas letais de 8,0 a 13,0ºC. Por outro lado, temperaturas em torno de 41,0ºC são consideradas como limite superior e a faixa ótima fica compreendida entre 26,0 e 28,0ºC (ZANIBONI FILHO, 2004; KUBITZA, 2000).

As tilápias apresentam uma considerável tolerância a altas salinidades, o que pode ser devido à sua provável origem marinha, suportam baixas concentrações de oxigênio dissolvido, assim como ampla faixa de alcalinidade e toleram altas concentrações de amônia, comparadas à maioria dos peixes. Em relação ao pH, considera-se o intervalo 7 e 8, como aquele ideal (TAVARES-DIAS, 2003; ZANIBONI FILHO, 2004, KUBITZA, 2000).

A espécie *Oreochromis niloticus* pertence a um importante grupo de peixes, sendo reconhecida como modelo biológico, devido à sua fácil manipulação, adaptação ao cativeiro, manutenção em laboratório e sensibilidade a presença de poluentes (WU; LIN; YANG, 2008; ALMEIDA et al, 2002).

Todos esses atributos levam a espécie a ser considerada adequada para ensaios laboratoriais de toxicidade, sendo um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático. Devido a isso, as mesmas são utilizadas frequentemente para

a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2007; ALVES-COSTA, 2001).

Deprende-se dessas características que muitos trabalhos, com diferentes objetivos, foram conduzidos empregando-se este organismo como bioindicador. Ensaios em meio contendo Cu, Cd e Zn, foram conduzidos objetivando-se verificar respostas dos organismos quanto à presença dos metais de forma isolada e em diferentes combinações, na produção de enzimas do estresse oxidativo e produção bruta de MTs (TONISSI, 2009).

Garcia-santos et al. (2007) verificaram após a exposição a $CdCl_2$ o aparecimento de lesões nas brânquias de *Oreochromis niloticus* devido a crescente contaminação no ambiente aquático.

Figueiredo-Fernandes et al. (2007) analisaram alterações histopatológicas no epitélio hepático e branquial de *Oreochromis niloticus* expostas a diferentes concentrações de cobre ($CuSO_4$). Este trabalho revelou influência do cobre ao nível da histologia da brânquia e do fígado, demonstrando os efeitos em diferentes concentrações.

Almeida et al. (2009), avaliaram a possível ligação entre exposição ao $CdCl_2$, produção de marcadores hepáticos do estresse oxidativo e a agressividade em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Pode-se concluir com esses estudos, que o metal altera as enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo, ao mesmo tempo em que diminui a agressividade da espécie.

Garcia-Santos; Fontainhas-Fernandes e Wilson (2006) observaram que a tolerância ao Cd pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é alta e concluíram que esta espécie poderia contribuir de modo significativo para a compreensão do mecanismo de toxicidade pela exposição ao cádmio em organismos aquáticos.

A tilápia pode também absorver moléculas orgânicas, como aquelas dos agroquímicos largamente empregados na agropecuária.

Estudo sobre a verificação da contaminação de *Oreochromis niloticus*, coletadas em frigoríferos do Estado Paraná, por compostos organofosforados e carbamatos, mostrou a necessidade de monitoramento constante quanto à presença de resíduos de praguicidas nesta importante matriz alimentícia, devido à possibilidade de contaminação dos tanques de criação nas pisciculturas (RODRIGUES et al., 2009).

Henares et al. (2008) realizaram um estudo envolvendo a toxicidade aguda e os efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica. Os autores verificaram que o diquat apresentou baixo risco de intoxicação à essa espécie e as alterações histopatológicas mais severas ocorreram somente nas concentrações mais elevadas.

Através dos estudos citados anteriormente, pode-se verificar que a espécie *Oreochromis niloticus* é frequentemente utilizada em testes toxicológicos, sendo reconhecida como um bioindicador apropriado para verificar a qualidade ambiental, aferindo desse modo na saúde do ecossistema.

2.6. Fatores que influenciam a toxicidade

Diversos fatores influenciam diretamente na toxicidade dos xenobióticos, entre os quais, pH, dureza da água, material orgânico dissolvido, estágios nutricionais, temperatura, biologia da espécie em questão e biodisponibilidade dos metais, entre outros (SPRAGUE, 1990).

De acordo com Aragão e Araújo (2006), a dureza total da água (composta principalmente por cálcio e magnésio) pode interferir na toxicidade de muitos poluentes, especialmente os metais. Estes se tornam menos tóxicos em águas consideradas duras, devido à competição dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} pelos sítios ativos de absorção dos organismos (LOCK et al., 2007) e à complexação dos metais em altas concentrações de hidróxidos e/ou carbonatos, associados normalmente à dureza elevada (SAMPAIO, 2008).

Esse fato pode ser verificado por Ebrahimpour, Alipour e Rakhshah (2010), que avaliaram a toxicidade de Cu e Zn em *Capoeta fusca* em águas mole, dura e muito dura (40, 150 e 380 mg L^{-1} $CaCO_3$) e concluíram que a mesma diminuiu com o aumento da dureza da água.

O pH de uma solução também podem interferir na toxicidade de um metal tanto pela competição de prótons como pela especiação química e biodisponibilidade dos metais na solução. Na primeira situação os prótons competem pelos grupos funcionais existentes na membrana celular das brânquias e com as moléculas de carbono orgânico dissolvido, com isso há uma maior

quantidade de íons metálicos livres na solução. Devido a isso, em baixos valores de pH, as moléculas de carbono orgânico dissolvido são protonadas, resultando em maior toxicidade para os organismos (VIJAYAVEL, 2010).

Em valores mais elevados de pH, a formação de hidróxidos e carbonatos metálicos é favorecida, levando a uma diminuição das espécies em sua forma livre, mais disponíveis à absorção pela biota, reduzindo desta forma a toxicidade (VIJAYAVEL, 2010).

Estudos realizados com alevinos de *Poecilia reticulata*, mostraram que o pH exerceu um forte efeito sobre a sobrevivência da espécie no Lago Dunas, reduzindo significativamente a toxicidade com o aumento dessa variável (ARAÚJO et al., 2008).

Çoğun e Kargin (2004), estudando os efeitos do pH sobre a mortalidade e acumulação de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) nos tecidos de *Oreochromis niloticus* puderam concluir que em valores baixos de pH (5,5) a acumulação de cobre nos tecidos da espécie em questão se mostrou maior comparado com os outros valores testados (7,8 e 9,5), revelando o aumento da toxicidade desse elemento com baixos valores de pH.

Outro fator que influencia a toxicidade dos contaminantes é a complexação dos metais com a matéria orgânica dissolvida. Essa relação pode ser constatada pelos autores Hollis, Muench e Playle (1997), que estudando a influência da matéria orgânica dissolvida sobre a absorção do cobre ($CuSO_4.5H_2O$) nas brânquias de "*rainbow trout*", observaram a redução da toxicidade devido à diminuição do cobre livre na solução.

Os autores também discutiram a influência do cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) sobre o acúmulo de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) nas brânquias dos mesmos organismos e concluíram que o cálcio apresenta um efeito protetor contra a toxicidade do cádmio por meio do mecanismo de competição. Portanto, situação ótima para um peixe sobreviver à poluição por metal, seria viver em água dura contendo quantidades moderadas de matéria orgânica dissolvida.

Estudos sobre a influência do cálcio e ácido húmico sobre a toxicidade de cádmio ($CdCl_2.2,5H_2O$) em *Rhinella arenarum* revelou que o Ca^{+2} na água ofereceu proteção contra a absorção e a acumulação do metal por meio de inibição competitiva. Nos sistemas contendo ácidos húmicos, uma quantidade de cádmio na

solução foi complexada, tornando-se assim menos biodisponíveis, diminuindo consequentemente sua toxicidade (MASTRÁNGELO; AFONSO; FERRARI, 2011).

El Deen, Zaki e Osman (2010), estudando a contribuição do ácido fúlvico na redução da toxicidade de cádmio em *Oreochromis niloticus* revelou que a presença de ácido fúlvico, reduziu consideravelmente a absorção do metal e a acumulação nos tecidos do peixe, enquanto que a quantidade de metal na água aumentou.

O estado nutricional dos organismos expostos a substâncias poluidoras também tem uma grande influência na toxicidade das mesmas. Esse fato pode ser corroborado pelo estudo realizado por Pelgrom et al. (1994), onde *Oreochromis mossambicus* foram expostas a concentrações subletais de cobre e cádmio em condições de organismos alimentados e não alimentados. Os autores puderam concluir que a quantidade total de Cu e Cd acumulado durante a exposição foi influenciada pelo estado nutricional do organismo, onde os alimentados se mostraram mais resistentes à acumulação dos metais do que os não alimentados, mostrando que no primeiro caso houve uma redução da toxicidade dos metais. Os autores apresentaram duas explicações para esse fato, onde a primeira refere-se às consequências fisiológicas da restrição alimentar, que pode determinar a capacidade de lidar com substâncias tóxicas exógenas e a segunda, relacionada à formação de complexos de Cu com as fezes presentes na água de peixes alimentados. Esta explicação sendo a menos provável nas condições experimentais realizadas.

Em relação à temperatura, o metabolismo energético dos organismos pode aumentar ou diminuir em função dessa variável, podendo ocorrer um aumento de duas vezes na taxa metabólica para cada aumento de 10°C na temperatura da água. Esse aumento também pode influenciar na solubilidade de algumas substâncias, assim como na quantidade de oxigênio dissolvido. Sendo assim, pode-se assumir que um aumento na temperatura resulta em maior toxicidade para determinadas substâncias. (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Estudo realizado por Karakoç e Dinçer (2003) sobre o efeito da temperatura na acumulação de zinco nas brânquias, fígado e rim em *Oreochromis niloticus* mostrou que a acumulação do metal pelos órgãos em estudo foi maior na temperatura de 30°C do que a 15°C. Os autores concluíram que o aumento na temperatura causa mudanças na atividade metabólica de *Oreochromis niloticus* e a diminuição dessa variável diminuiu a absorção da taxa de Zn no organismo.

2.7. Toxicidade dos metais

2.7.1. Cobre

O cobre é um elemento traço essencial que apresenta um importante papel nas funções bioquímicas e fisiológicas dos organismos. Esse atua, entre outros, na participação da cadeia respiratória, síntese de hemoglobina, aproveitamento do ferro, síntese do colágeno e elastina e funciona como cofator para diferentes enzimas com papel central no metabolismo celular, por exemplo, lisil oxidase, citocromo c oxidase e superóxido dismutase (LEHNINGER, 1990; CHAMPE; HARVEY, 1996; MURRAY et al., 1998; revisto por SORENSEN, 1991; ISANI et al., 2011).

Ao mesmo tempo, o Cu livre é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio, que prejudica o funcionamento de várias moléculas essenciais para a sobrevivência dos organismos. Por esse motivo, ele é fortemente regulado pelos organismos vivos através de complexos mecanismos homeostáticos que regulam a absorção, distribuição, sequestro e exportação (ISANI et al., 2011).

Seu aumento no ambiente aquático deve-se principalmente ao desenvolvimento industrial, da agricultura e da mineração (SPERLING, 1993), e essa contaminação é de particular importância do ponto de vista ecológico, uma vez que esses são vistos como uma potente ameaça aos organismos desse ecossistema.

A toxicidade do cobre pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles o ambiente de exposição, forma química do elemento e espécie exposta, porém o mecanismo pelo qual o cobre agirá no organismo depende de sua absorção, que afetará diretamente a sua toxicidade. Uma vez absorvido, o cobre induz a vários danos fisiológicos e bioquímicos que podem resultar na morte do organismo exposto (SANCHEZ et al., 2005).

Posteriormente a esta absorção, o cobre é preponderantemente transportado pelo sangue via proteína ceruloplasmina, como pode ser constatado pelo trabalho realizado por Pelgrom et al. (1995), que verificou após a exposição da tilápia

mossâmbica, a várias concentrações de cobre, que havia grande quantidade dessa proteína no sangue desses espécimes.

Esse contaminante é reconhecido como um dos metais mais tóxico para os peixes, pois causa diminuição de sais no sangue do organismo ocasionado pelo efluxo de eletrólitos, acarretando um colapso cardiovascular devido à alta viscosidade resultante (WILSON; TAYLOR, 1993a e 1993b; revisto por HANDY; EDDY; BAINES 2002).

De acordo com Li et al. (1998), a exposição ao cobre provoca várias alterações histopatológicas no epitélio branquial, como por exemplo a inibição da atividade da enzima Na^+/K^+-ATPase, através de sua alteração estrutural por meio da ligação covalente de Cu^{2+} livre a grupos SH da enzima, resultando em distúrbios osmorregulatórios. Com o intuito de restaurar a absorção branquial do Na^+, mantendo a homeostase desse cátion no interior dos organismos, processos bioquímicos e fisiológicos são desencadeados pelos indivíduos expostos (LI et al., 1998). Como exemplo, pode-se citar o estudo realizado por PELGROM et al. (1995) que observaram um incremento na produção de células mitocondriais, também chamadas de clorídricas, após exposição por seis dias a este metal em concentrações de 3,2 μM de cobre livre.

Outras alterações devido à exposição prolongada desse metal foram também descritas, como por exemplo, a perda de controle ionoregulatório branquial, alterações histológicas nas brânquias e fígado, estresse oxidativo, mudanças no metabolismo hepático intermediário, redução no crescimento e falhas na reprodução (CHEN et al., 2012).

2.7.2. Cádmio

Conhecido como metal não essencial, o cádmio é persistente, não biodegradável e de toxicidade elevada, uma vez que causa efeitos deletérios aos organismos mesmo em baixas concentrações (BHAKTA; MUNEKAGE, 2008; SOARES et al., 2008; ALMEIDA et al., 2001).

Sua introdução no ambiente pode ser através de fontes antropogênicas e naturais, como atividades de fundição, produção de baterias, revestimentos eletrolíticos de metais, tintas, fertilizantes, estabilizadores plásticos, vulcanismo e queima de florestas (ROMAN et al., 2002; ATLI; CANLI, 2007; BURGER, 2008).

Dentre os metais mais tóxicos presentes no sistema aquático, o cádmio está no topo, pois o mesmo apresenta uma meia vida biológica elevada, acumulando-se desde o menor invertebrado ao peixe carnívoro (ÇOĞUN; YÜZEREROĞLU; KARGIN, 2003).

A exposição a esse metal pode perturbar as funções centrais, afetando vários processos bioquímicos e fisiológicos dos peixes, levando a várias alterações patológicas no fígado, testículos, cérebro, sistema nervoso, rins, baço e medula óssea (ALMEIDA et al., 2001; BENADUCE et al., 2008). Além disso, o Cd está relacionado à ocorrência de anemia, fraturas vertebrais, hipocalcemia, hipocalemia, hiperglicemia, diminuição da eficiência digestiva, alteração da sensibilidade do olfato, efeitos adversos no crescimento, reprodução e na regulação de íons. Natação errática e mortalidade podem ser também incluídas (BENADUCE et al., 2008, BURGER, 2008).

Uma das principais causas de mortalidade dos organismos intoxicados ao cádmio é a hipocalcemia, através da inibição da absorção de cálcio pelas brânquias, bem como por células intestinais. Essa situação pode causar deformidades esqueléticas, alterações no equilíbrio de cálcio no organismo, modificações na integridade da membrana celular e na permeabilidade branquial (WONG; WONG, 2000; WU; SHIN; HO, 2007; DE LA TORRE; SALIBIAN; FERRARI, 2000).

Esse mecanismo de deficiência pode ser atribuído à ação competitiva de Cd^{2+} sob a via ativa Ca^{2+}-ATPase basolateral das células clorídricas branquiais. Sendo assim, o aumento da concentração de Ca^{2+} na água constitui-se em benefício contra a deposição de cádmio nas brânquias dos peixes (CINIER et al., 1997; MATSUO et al., 2005)

Outro efeito à exposição ao cádmio são as alterações de atividades enzimáticas, consequência da ligação do metal a seus grupos funcionais, deslocando metais essenciais como Cu e Zn, os quais estão associados a essas enzimas como co-fatores. Isso ocorre devido à semelhança química desse contaminante com o zinco, sendo facilmente absorvido por animais e estocado em órgãos na forma de complexos com metalotioneínas (Mts). Essa substituição de

cátions essenciais por Cd é um dos mais importantes mecanismos de efeito deste metal (SURA et al., 2006; LIONETTO et al., 2000; ERK et al., 2005).

2.8. Bioacumulação

Quando introduzidos no ambiente aquático, alguns xenobióticos podem apresentar características de persistência, ou exibirem alta resistência à degradação biótica e/ou abiótica, bioacumulando-se nos tecidos e órgãos dos organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Essa bioacumulação é verificada quando uma substância contaminante é absorvida em uma proporção maior do que aquela que é excretada, ou eliminada (GOMES; SATO, 2011).

O interesse por estudos de bioacumulação foi desencadeado na década de 1960, devido à toxicidade em peixes e moluscos causada pelos resíduos de metilmercúrio, liberados por uma indústria de acetaldeído e cloreto de vinila no Japão, e pela elevada mortalidade e falhas reprodutivas em aves devido a lançamentos de pesticidas organoclorados (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A acumulação de contaminantes metálicos em organismos aquáticos pode ser influenciada pela sua disponibilidade, que está relacionada à especiação química, competição com outros íons, capacidade de interação com substâncias particuladas e dissolvidas e mecanismos de absorção, regulação e eliminação das espécies expostas ao contaminante (CARRIQUIRIBORDE; RONCO, 2008).

O tegumento (pele e escamas), respiração (brânquias e tegumento) e alimentação, podem ser consideradas algumas vias de introdução de substâncias contaminantes que podem acumular em peixes expostos a elas (GOMES; SATO, 2011).

Alguns fatores relativos aos contaminantes como solubilidade, estabilidade e estequiometria da molécula; relativos à água como carbono orgânico dissolvido, dureza total e salinidade; e relativos à biota como biotransformação, teor de lipídios, depuração, dieta, taxa metabólica e metalotioneínas são alguns fatores que são determinantes ao processo de bioacumulação (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Muitos estudos envolvendo mecanismos de bioacumulação de metais em organismos aquáticos e em órgãos e tecidos destes podem ser encontrados na literatura.

Tao et al. (2012) estudando a bioacumulação de Cu, Zn, Cr, Ni, Cd e Pb em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (fitoplâncton, zooplâncton, zoobentos e peixes) no lago Taihu, observaram que a concentração de metais seguiu a seguinte ordem, fitoplâncton>zooplâncton>zoobentos>peixes e que os metais essenciais apresentaram uma maior bioacumulação do que os não essenciais.

Biuki et al. (2011) analisando o comportamento acumulativo do cádmio e chumbo em fígado de *Chanos chanos* após exposição a três concentrações subletais de cada poluente por períodos experimentais agudos (12, 24 e 96h) e crônicos (7, 14 e 21 dias) concluíram que a bioacumulação aumentou no órgão em questão com o tempo de exposição e com a concentração do poluente.

Estudo relacionado à bioacumulação de cádmio ($CdCl_2.2.5H_2O$) em rins, fígado e músculo de *Cyprinus carpio* revelou que a concentração do metal no rim e fígado aumentou rapidamente para os níveis de saturação e uma correlação positiva aconteceu entre o aumento de metalotioneínas e aumento da tolerância do peixe ao metal. Os autores também concluíram que após três meses de exposição ao cádmio, a concentração do metal aumentou no músculo, indicando que após atingir o limite de saturação no fígado e rins, a acumulação do contaminante no músculo foi estimulada (CINIER et al., 1997).

Dupreez e Steyn (1992), estudando a concentração dos metais Fe, Zn, Pb, Ni, Cu, Cd e Mn, observaram a presença destes em diferentes concentrações em todos os órgãos e tecidos analisados. Concentrações mais elevadas de Cd, Mn, Ni e Pb, foram encontradas no estômago, enquanto que o Zn foi encontrado nas gônadas. Cu e Fe sendo detectados em maiores concentrações no fígado.

Mansouri, Ebrahimpour e Babaei (2012), estudando a bioacumulação e eliminação de níquel nos órgãos de *Capoeta fusca*, puderam encontrar uma ordem de bioconcentração nos tecidos e órgãos analisados, sendo brânquias>fígado>músculo>pele. Os autores também investigaram o processo de eliminação desse metal pelo peixe e concluíram que para a menor concentração testada (4,5 mg L^{-1}) a ordem de detoxificação foi verificada na sequência:

brânquias>pele>músculo>fígado. Para a maior concentração avaliada (12,7 mg L^{-1}), uma leve alteração sequencial foi observada: brânquias>pele>fígado>músculo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo visa conhecer aspectos da toxicidade dos metais Cu (essencial) e Cd (não essencial), isoladamente e em associação, em Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*).

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar a toxicidade aguda (CL_{50}) para Cu em tilápias;
2. Determinar a toxicidade aguda (CL_{50}) para Cd em tilápias;
3. Determinar a toxicidade aguda (CL_{50}) para Cd + Cu em tilápias;
4. Verficar a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos desses elementos químicos sobre os organismos estudados;
5. Observar essas interações em níveis de toxicidade crônica;
6. Determinar a bioacumulação dos metais cobre e cádmio no tecido muscular, brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus*;
7. Determinar o potencial das tilápias como bioindicadoras da contaminação existente por Cd e Cu

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Estudos Ambientais (CEA), Rio Claro – SP, Universidade Estadual Paulista. A metodologia empregada foi estabelecida conforme recomendações da ABNT 15088 (2004) e USEPA (2002).

4.1. Organismos-teste

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus)*, macho-revertidos, pesando aproximadamente 10,0 gramas, foram obtidas na Piscicultura Rio Nilo em São João da Boa Vista - SP e no Pólo Regional Vale do Paraíba em Pindamonhangaba, SP.

Os organismos obtidos na piscicultura Rio Nilo foram utilizados nos experimentos preliminares e agudos, enquanto que aqueles obtidos no Pólo Regional foram acondicionados para serem empregados no ensaio crônico.

4.2. Aclimatação dos peixes

Os organismos-teste foram transportados ao laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Estudos Ambientais de Rio Claro em sacos plásticos oxigenados, próprios para o transporte dos mesmos, onde foram acondicionados 100 indivíduos por unidade (Figura 2).

No laboratório, duas caixas d'água de 500 litros de capacidade, contendo água desclorada e proveniente da rede de abastecimento (Figura 3) foram preparadas.

A descloração da água foi efetuada por repouso, no interior de reservatórios de 1000 litros por um período mínimo de 02 dias (Figura 4).

Figura 2 – Acomodação das embalagens plásticas contendo os organismos-testes em veículo que efetua o transporte do lote de alevinos até tanque de aclimatação, no laboratório do CEA/UNESP, Rio Claro

Figura 3 – Caixas d'água de 500 litros preparadas com água desclorada para aclimatação dos organismos-teste

Figura 4 – Reservatórios de 1000 litros, interno e externo a sala, utilizados no processo de descloração da água proveniente da rede de abastecimento

Em um período de dois meses, anteriores à chegada dos organismos, o filtro biológico permaneceu em plena atividade com o objetivo de proliferar toda flora bacteriana necessária para promover uma filtragem adequada e consequentemente uma condição ótima para a manutenção dos organismos-teste.

Para liberação, os peixes foram mantidos no interior dos sacos plásticos sob a água das caixas d'água por alguns minutos para que as temperaturas fossem equilibradas (Figura 5A). Após esta etapa, acrescentou-se lentamente água das caixas d'água no interior dos sacos plásticos para atingir o equilíbrio de pH (Figura 5B). Posteriormente, os peixes foram introduzidos nas caixas d'água de 500 litros com auxílio de redes, iniciando-se o processo de aclimatação por um período de quinze dias (Figura 5C).

Figura 5 – Sequência do procedimento e equalização da temperatura da água contida na embalagem plástica com a temperatura da caixa d'água de aclimatação (A); adaptação do novo meio abiótico (B); liberação dos peixes com auxílio de uma rede (C)

A água das caixas d'água de aclimatação passou por um processo constante de filtragem utilizando um filtro biológico tipo "Dry-Wet" contendo uma bomba submersa marca Resun com uma vazão de 3000 L h^{-1} (Figura 6). Para evitar escurecimento da água e alteração de variáveis, uma troca diária de aproximadamente 30% da água das caixas d'água de aclimatação foi realizada.

Figura 6 – Filtro biológico tipo “Dry-Wet” utilizado para o processo de filtragem das duas caixas d’água de aclimatação

Foi realizada a medição diária de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) nas caixas d’água de 500 litros durante o período de aclimatação dos organismos-teste. As medições da temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram efetuadas utilizando-se a sonda YSI Incorporated 556 MPS.

Para controlar a temperatura nas caixas de aclimatação em valores próximos a 26,0±1°C, foi utilizado um termostato eletrônico marca Heater de 300 W.

A alimentação dos organismos-teste foi realizada diariamente com ração comercial extrusada marca Fri-ribe, com teor proteico de 32% e 4,0 a 6,0 mm de granulometria. A ração comercialmente disponível foi triturada durante as primeiras semanas de aclimatação para que todos os peixes pudessem ter acesso à alimentação; posteriormente a este período, ração em seu tamanho normal foi oferecida aos organismos (Anexo A - Características nutricionais da ração).

4.3. Ensaios preliminares com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$

Os ensaios preliminares com os sais cloreto de cobre ($CuCl_2$), cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) e cloreto de cobre ($CuCl_2$) + cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) com duração de 48 horas, foram realizados para que fossem estabelecidos os limites de concentrações a serem fixados nos ensaios definitivos desses metais.

Os experimentos preliminares foram conduzidos em duplicata, abrangendo-se uma ampla faixa de concentrações dos elementos, distribuídas em forma logarítmica (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977). Para isso, foram utilizados aquários de plásticos com o intuito de evitar a adsorção dos metais às paredes dos recipientes (Figura 7).

Telas de proteção, evitando perdas de organismos foram empregadas em ambas às situações.

Figura 7 – Cubas plásticas com telas na superfície, utilizadas nos ensaios de toxicidade com cobre, cádmio e cobre+cádmio

As concentrações de Cu, Cd e Cu+Cd foram: 0,0 mg L^{-1} (Controle), 0,1 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1}, 10,0 mg L^{-1} e 100,0 mg L^{-1}. Em cada um dos tratamentos, incluindo o controle, foram adicionados 05 organismos (*Oreochromis niloticus*) em aquários contendo 20,0 litros de solução.

Os organismos utilizados nos ensaios preliminares permaneceram anteriormente à introdução do metal na solução, por um período de 48 horas de aclimatação nas cubas experimentais, apenas com água utilizada no teste.

De acordo com a ABNT (Norma Técnica n^0 15.088), todos os organismos utilizados nos ensaios preliminares ficaram sem alimentação por um período de 24 horas anteriores ao início do teste.

Para o preparo das soluções nas cubas experimentais, partiu-se de uma solução-estoque de 1.000,0 mg L^{-1} Cu e Cd. Para a obtenção destas foram pesados 2,11g do sal $CuCl_2$ e 1,79g do sal $CdCl_2.H_2O$ completando-se o volume a 1,0 L com água desionizada.

Para as concentrações desejadas nos ensaios, foram acrescentados nas cubas experimentais das concentrações de 0,1 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1}, 10,0 mg L^{-1} e 100,0 mg L^{-1}, após o período de aclimatação dos organismos, 2,0 mL, 20,0 mL, 200,0 mL e 2,0 L respectivamente das soluções-estoque 1.000,0 mg L^{-1} de Cu e Cd, sendo que os mesmos volumes de água dos aquários foram retirados anteriormente à introdução dos metais.

Antes da introdução das soluções nos aquários, os organismos-testes foram retirados das cubas experimentais e sua biomassa mensurada utilizando uma balança de prato em cima da marca BEL instalada no interior do laboratório (Figura 8A). Os mesmos retornaram aos recipientes experimentais após a introdução e homogeneização das soluções (Figura 8B).

Figura 8 – Determinação da biomassa dos organismos-teste anteriormente a adição dos metais nas cubas experimentais (A) e introdução dos organismos-teste nos aquários posteriormente a adição e homogeneização das soluções (B)

A Tabela 1 ilustra a média das relações massa/volume (g L^{-1}) dos cinco organismos-teste em conjunto, presentes nas cubas experimentais de cada concentração dos ensaios preliminares de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ respectivamente.

Tabela 1 – Relação massa/volume (g L^{-1}) média, relativa aos cinco organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente aos ensaios preliminares de soluções $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ compreendidas entre 0,0 e 100,0 mg L^{-1}

Concentração (mg L^{-1})	**$CuCl_2$ (g L^{-1})**	**$CdCl_2.H_2O$ (g L^{-1})**	**$CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ (g L^{-1})**
0,0	2,99 ± 0,23	3,07 ± 0,65	3,26 ± 1,29
0,1	2,01 ± 0,31	2,83 ± 0,16	2,90 ± 0,50
1,0	2,62 ± 0,07	3,74 ± 0,23	2,07 ± 0,55
10,0	2,49 ± 0,79	4,03 ± 1,14	2,96 ± 0,42
100,0	3,09 ± 0,58	3,76 ± 0,22	3,20 ± 0,83

Os ensaios foram realizados na forma estática e conduzidos em meio de água livre de cloro. Oxigenação suplementar em cada cuba experimental para manter os níveis de oxigênio próximos da saturação foi suprida.

As variáveis pH, temperatura, concentração de metal na solução e oxigênio dissolvido (OD), foram aferidas no início dos experimentos, e posteriormente a cada 24 horas.

Temperatura, pH e oxigênio dissolvido, foram medidos com auxílio da sonda YSI Incorporated 556 MPS (Figura 9), enquanto que a concentração do metal dissolvido, foi determinada utilizando-se o espectrômetro ótico (ICP-OES) marca Thermo Scientific, modelo ICAP 6000 série, em alíquotas de 10mL de solução, diluídas de forma apropriada à sensibilidade do equipamento.

Os padrões utilizados para as determinações das concentrações de metais nas soluções foram 0,0, 0,1 mg L^{-1}, 0,5 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1} e 2,0 mg L^{-1} e os comprimentos de ondas (λ) e limites de detecção (LOD) utilizados para analise foram 324,7 nm; 2,66 µg L^{-1} e 228,8 nm; 8,25 µg L^{-1} para cobre e cádmio respectivamente.

Figura 9 – Determinação das variáveis pH, temperatura e OD através da utilização da sonda YSI Incorporated 556 MPS

A dureza total, medida apenas no início do teste preliminar e nos controles, foi determinada utilizando-se titulação com EDTA, tomando-se como base a Norma ABNT 5761 (1984).

A aferição da dureza apenas nos controles de cada ensaio preliminar deve-se à interferência dos metais presentes nas soluções. Essa interferência ocorre devido à constante de formação Cu^{2+}-EDTA e Cd^{2+}-EDTA serem maiores do que a constante de formação Ca^{2+}-EDTA, sendo respectivamente 18,80; 16,46 e 10,70. Assim a visualização do ponto de viragem fica prejudicada devido à ligação metal-EDTA serem significativamente mais fortes.

Uma manutenção diária foi realizada nos aquários durante o período experimental. As fezes e outros resíduos presentes no fundo de cada aquário foram retirados por meio de sifonamento (Figura 10). Esse procedimento foi realizado para que não houvesse acúmulo de resíduos nos aquários, os quais poderiam sofrer adsorção dos metais solúveis.

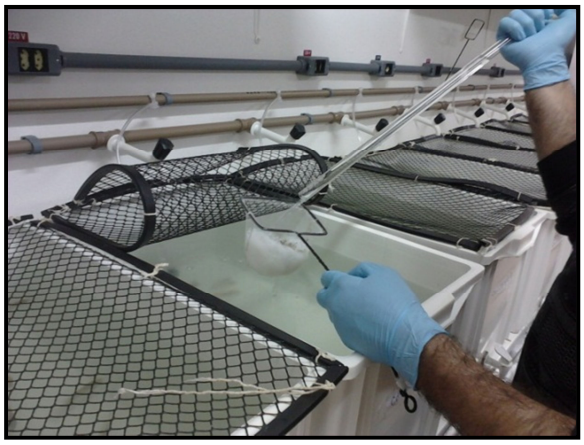

Figura 10 – Processo de manutenção diária das cubas experimentais através de sifonamento para retirada das fezes e outros resíduos acumulados no fundo dos aquários

Os óbitos foram retirados dos aquários a cada 24 horas, pesados e dissecados. Fígado, brânquias e amostras do tecido muscular (Figura 11) foram retirados e acondicionados no congelador dentro de pequenas embalagens plásticas (Figura 12), para posterior preparo e determinação dos teores totais dos metais.

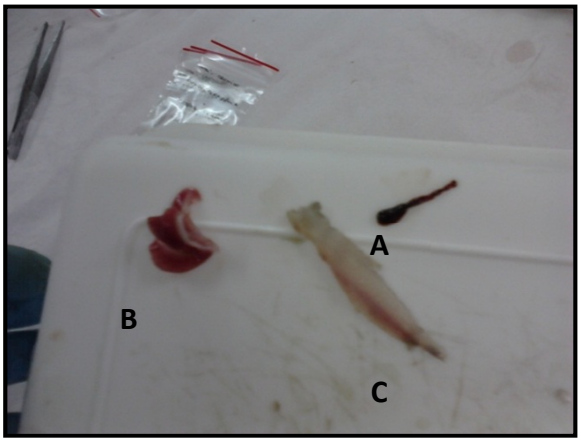

Figura 11 – Fígado (A), Brânquias (B) e tecido muscular (C) retirados dos organismos-teste

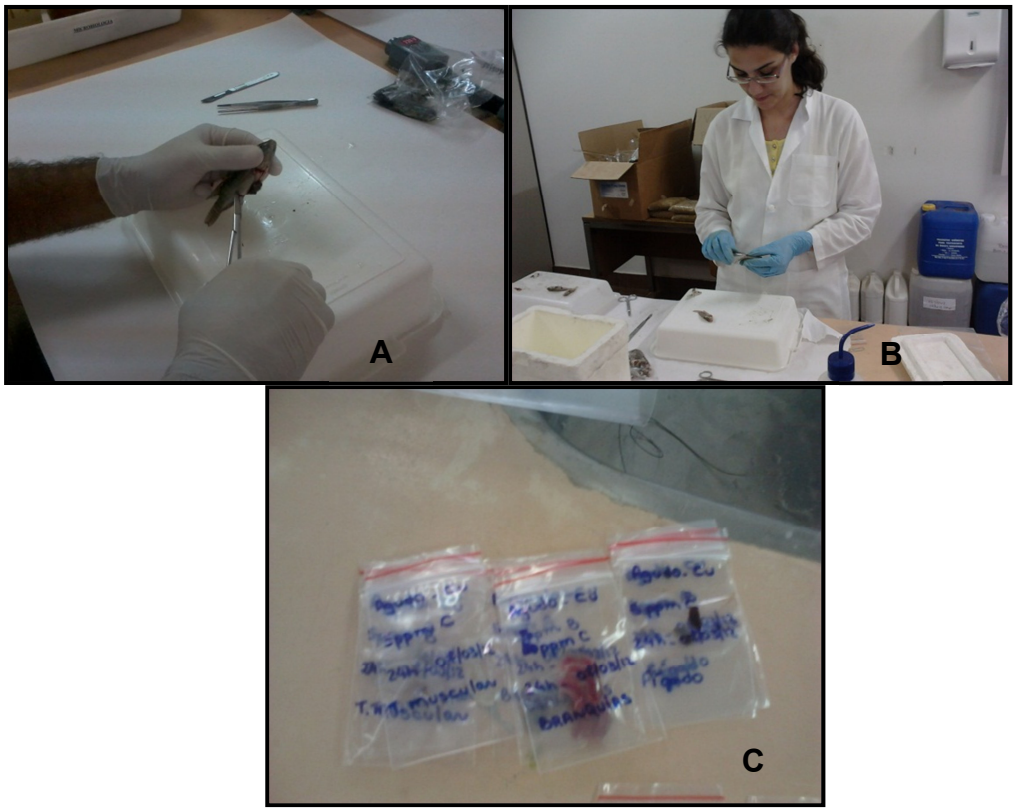

Figura 12 – Dissecação dos organismos-teste indicando a retirada do fígado, das brânquias e amostras do tecido muscular (A) e (B), e acondicionamento dos órgãos retirados em pequenos sacos plásticos para posterior preparo de amostras e determinação da concentração dos metais (C)

Decorridas 48 horas de ensaio, os organismos sobreviventes foram sacrificados com auxílio de gelo, a uma temperatura próxima a 0°C (Figura 13A), ocorrendo o óbito dos organismos sacrificados cerca de alguns segundos após a colocação dos mesmos na água resfriada. A seguir, as amostras foram pesadas e dissecadas, sendo-lhes retirados o fígado, as brânquias e tecido muscular, os quais foram acondicionados em embalagens plásticas devidamente etiquetadas (Figura 13B) e acondicionados em congelador.

Figura 13 – Procedimento de sacrifício dos organismos-teste sobreviventes após completado o período de 48 horas do ensaio preliminar (A); Peixes acondicionados no interior de sacos plásticos devidamente etiquetados para armazenagem em congelador para futura dissecação (B)

4.4. Ensaios agudos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$

Com o objetivo de determinar a toxicidade aguda de cobre e cádmio em *Oreochromis niloticus*, foram realizados ensaios definitivos de duração de 96 horas com os metais nas formas isoladas e em combinação. A metodologia empregada nos ensaios definitivos foi estabelecida conforme recomendações da ABNT 15088 (2004) e USEPA (2002).

As concentrações estabelecidas para os ensaios definitivos foram baseadas nos resultados obtidos dos testes preliminares para essas mesmas substâncias. Estas estando compreendidas entre a maior concentração nominal do agente tóxico que não se observou letalidade e a menor concentração nominal do agente tóxico, que causou letalidade a 100% dos organismos (ABNT, 2004), além do tratamento controle.

Para o teste agudo com $CuCl_2$, as concentrações utilizadas foram: 0,0 mg L^{-1} (Controle), 0,5 mg L^{-1} Cu, 1,0 mg L^{-1} Cu, 2,5 mg L^{-1} Cu, 5,0 mg L^{-1} Cu e 10,0 mg L^{-1} Cu; para o teste com $CdCl_2.H_2O$ utilizaram-se as seguintes concentrações: 0,0 mg L^{-1} (Controle), 1,0 mg L^{-1} Cd, 5,0 mg L^{-1} Cd, 10,0 mg L^{-1} Cd, 25,0 mg L^{-1} Cd e 50,0 mg L^{-1} Cd; e para o teste com $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$, as concentrações foram: 0,0 mg L^{-1} (Controle), 0,5 mgL^{-1} (Cu+Cd), 1,0 mg L^{-1} (Cu+Cd), 2,5 mg L^{-1} (Cu+Cd), 5,0 mg L^{-1} (Cu+Cd) e 10,0 mg L^{-1} (Cu+Cd), de cada um dos metais componentes da mistura.

Os ensaios agudos foram realizados em triplicata, totalizando 18 aquários, contendo 10 organismos-teste e 40 litros de solução-teste em cada uma das unidades experimentais (Figura 14).

Figura 14 – Vista da unidade experimental contendo 10 organismos-testes (*Oreochromis niloticus*) em aquário contendo 40 litros de solução

Os organismos utilizados nos ensaios definitivos permaneceram em aclimatação nas cubas experimentais por um período de 48 horas, mantidos apenas com água utilizada no teste, previamente à introdução dos sais na solução.

À semelhança dos ensaios preliminares, e em acordo com a Norma ABNT 15088, todos os organismos utilizados nos ensaios agudos ficaram sem alimentação por um período de 24 horas.

A partir das soluções estoques 1.000,0 mg L^{-1} de Cu e Cd, foram introduzidos aos aquários 20,0 mL, 40,0 mL, 100,0 mL, 200,0 mL, e 400,0 mL para o estabelecimento das respectivas concentrações de 0,5 mg L^{-1} Cu e (Cu+Cd), 1,0 mg L^{-1} Cu e (Cu+Cd), 2,5 mg L^{-1} Cu e (Cu+Cd), 5,0 mg L^{-1} Cu e (Cu+Cd) e 10,0 mg L^{-1} Cu e (Cu+Cd), quando considerados os ensaios de Cu e de Cu+Cd. Neste procedimento, os mesmos volumes de água dos aquários eram retirados anteriormente à introdução das soluções de metais.

Para o experimento com cloreto de cádmio, foram acrescentados 0,040 L, 0,2 L, 0,4 L, 1,0 L, e 2,0 L da solução-estoque de 1.000,0 mg L^{-1} Cd obtendo-se as concentrações de 1,0 mg L^{-1} Cd, 5,0 mg L^{-1} Cd,10,0 mg L^{-1} Cd, 25,0 mg L^{-1} Cd e 50,0 mg L^{-1} Cd, respectivamente.

Previamente à introdução das soluções aos aquários, os organismos-testes foram retirados das cubas experimentais e sua biomassa foi mensurada utilizando-se a mesma balança de prato em cima utilizada nos ensaios preliminares.

Os organismos-teste foram retornados aos recipientes experimentais após a introdução e homogeneização das soluções.

As Tabelas 2 e 3, apresentam a média das relações massa/volume (g L^{-1}) dos dez organismos-teste, de cada um dos tratamentos dos ensaios definitivos de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Tabela 2 – Relação massa/volume (g L^{-1}) média relativa aos dez organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente aos ensaios definitivos de soluções $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ compreendidas entre 0,0 e 10,0 mg L^{-1}

Concentração (mg L^{-1})	**$CuCl_2$ (g L^{-1})**	**$CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ (g L^{-1})**
0,0	5,14 ± 1,76	5,95 ± 1,04
0,5	4,09 ± 0,26	6,15 ± 0,32
1,0	3,46 ± 0,83	4,87 ± 0,83
2,5	4,04 ± 1,40	5,56 ± 0,43
5,0	3,69 ± 1,21	5,11 ± 0,21
10,0	4,13 ± 1,39	4,20 ± 0,20

Tabela 3 – Relação massa/volume (g L^{-1}) média relativa aos dez organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente ao ensaio definitivo de $CdCl_2.H_2O$, compreendidas entre 0,0 e 50,0 mg L^{-1}

Concentração (mg L^{-1})	$CdCl_2.H_2O$ (g L^{-1})
0,0	3,70 ± 0,43
1,0	3,44 ± 0,32
5,0	4,40 ± 0,93
10,0	4,82 ± 0,44
25,0	3,79 ± 0,84
50,0	4,40 ± 0,52

A forma de condução deste ensaio agudo seguiu todo o protocolo empregado nos ensaios preliminares descritos, incluindo-se as variáveis monitoradas e os procedimentos de análises químicas. Exceção dada a variável amônia, que foi monitorada no início e a cada 24 horas, sendo analisada através do sistema de análises por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis) (REIS et al., 1997).

Os padrões utilizados para as determinações das concentrações dos metais presentes nas soluções para as amostras dos ensaios agudos foram 0,0; 0,5 mg L^{-1}; 1,0 mg L^{-1}; 2,0 mg L^{-1} e 5,0 mg L^{-1}. As análises tiveram como limite de detecção (LOD), 2,66 µg L^{-1} para cobre e 8,25 µg L^{-1} para cádmio, medições efetuadas a 324,7 nm e 228,8 nm, para cobre e cádmio respectivamente.

Para a aferição da amônia, 25,0 mL de amostras foram obtidas, em cada um dos aquários, no início do período experimental e, posteriormente, a cada 24 horas. As amostras foram preservadas pela adição de 25,0 µL de H_2SO_4 concentrado, e acondicionadas à temperatura de 4^0C até determinação (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 1995), sendo filtradas em filtros de acetato de celulose de 0,45 µm. Os padrões utilizados para a determinação foram 0,0, 1,0 mg L^{-1}, 2,0 mg L^{-1}, 4,0 mg L^{-1}, 6,0 mg L^{-1} e 8,0 mg L^{-1} NH_4^+ , e o LOD, 0,1 mg L^{-1}.

A concentração em mg L^{-1} de amônia livre na solução é função da temperatura e pH, e é calculado utilizando o valor percentual obtido a partir de tabela em pH e temperatura adequada, multiplicando-a pela concentração de amônia total presente na amostra (USEPA, 2002) (vide Anexo B).

A dureza total, medida no primeiro e último dia dos testes agudos nos controles, pelas razões explicadas no item 4.3, foi aferida utilizando-se o método titulométrico com EDTA, tendo como base a Norma ABNT 5761 (1984).

Uma manutenção diária foi realizada nos aquários durante o período experimental. As fezes e outros resíduos presentes nos aquários foram retirados por meio de sifonamento (Figura 10). Esse procedimento foi realizado para que não houvesse acúmulo de resíduos no fundo dos aquários, não causando dessa forma interferência nos resultados.

A cada 24 horas de ensaio os óbitos foram retirados prontamente dos aquários, pesados e dissecados, retirando-se o fígado, as brânquias e tecido muscular (Figura 11), sendo estas acondicionadas no congelador dentro de pequenas embalagens plásticas (Figura 12), para futuras análises dos teores totais dos metais.

Passadas às 96 horas de ensaio, os peixes sobreviventes foram sacrificados com auxílio de gelo, seguindo procedimento anteriormente descrito, conforme Figuras 13A e 13B.

4.5. Ensaios crônicos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$

Os ensaios crônicos dependem diretamente dos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais utilizadas são calculadas a partir da CL_{50}. Esses testes possibilitam avaliar o processo de intoxicação em condições não tão agressivas, permitindo desta forma a sobrevivência dos organismos expostos.

Os organismos utilizados nesses ensaios foram fornecidos pelo Pólo Regional Vale do Paraíba em Pindamonhangaba, da APTA (Associação Paulista de Tecnologia do Agronegócio, Secretaria de Agricultura, SP), onde passaram pelo mesmo processo de adaptação elucidado no item 4.2 para os ensaios de toxicidades preliminar e agudo.

Os ensaios crônicos com os sais $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$ tiveram duração de 21 dias e foram realizados simultaneamente.

Os organismos utilizados nesses ensaios foram também submetidos à aclimatação nas cubas experimentais por um período de 48 horas, mantidos apenas

com água utilizada no teste, e os mesmos foram alimentados diariamente durante todo o período experimental com ração comercial extrusada marca Fri-ribe, com teor proteico de 32% e 4,0 a 6,0 mm de granulometria.

O experimento foi constituído de duas concentrações de cada metal isoladamente e em combinação, sendo estas aproximadamente iguais a $CL_{50}/10$ e a média dos logaritmos das $CL_{50}/10$ e $CL_{50}/100$. Essas concentrações foram 0,35 mg L^{-1} Cu e 0,120 mg L^{-1}Cu; 2,0 mg L^{-1} Cd e 0,65 mg L^{-1} Cd; e 0,140 mg L^{-1} Cu+Cd e 0,05 mg L^{-1} Cu+Cd.

Para a obtenção dessas concentrações, partiu-se de uma solução estoque de 1.000,0 mg L^{-1} de $CuCl_2$ e $CdCl_2.H_2O$, onde seu preparo foi idêntico ao dos ensaios preliminar e agudo.

Para a concentração de 0,35 mg L^{-1} Cu e 0,120 mg L^{-1} Cu, foi adicionado aos respectivos aquários 17,5 e 6,0 mL da solução-estoque 1.000 mg L^{-1} $CuCl_2$; 100,0 e 32,5 mL da solução-estoque 1.000 mg L^{-1} $CdCl_2.H_2O$ para as concentrações 2,0 mg L^{-1} Cd e 0,65 mg L^{-1} Cd e 7,0 e 2,5 mL de ambas as soluções-estoque para 0,140 mg L^{-1} Cu+Cd e 0,05 mg L^{-1} Cu+Cd, retirando-se os mesmos volumes de água dos aquários previamente à introdução do metal.

A forma de introdução das soluções nas cubas experimentais deste ensaio crônico seguiu o mesmo protocolo dos experimentos preliminar e agudo, incluindo o procedimento utilizado para medida da biomassa.

A Tabela 4, ilustra a média da relação massa/volume (g L^{-1}) dos quinze organismos-teste em conjunto presentes nas cubas experimentais de cada concentração do ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Tabela 4 – Relação massa/volume (g L^{-1}) relativa aos quinze organismos-teste utilizados, nas cubas experimentais de cada concentração referente ao ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$, $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Concentração (mg L-1)	g L^{-1}
0,0	3,49 ± 0,16
0,120 Cu	3,31 ± 0,74
0,35 Cu	2,89 ± 0,73
0,65 Cd	2,96 ± 0,97
2,0 Cd	3,21 ± 0,69
0,05 Cu+Cd	3,24 ± 0,17
0,140 Cu+Cd	2,99 ± 0,02

O ensaio foi realizado de forma semi-estática, em duplicata, contendo 50 litros de solução-teste e 15 organismos em cada uma das unidades experimentais. Quatro unidades foram utilizadas para tratamento controle, sendo que dois desses aquários não foram alterados durante todo o período de duração do experimento, para que pudéssemos verificar a sanidade dos organismos e a validade do teste.

Foram procedidas trocas de ¼ de volume de água em períodos de 96 horas objetivando-se manter as concentrações iniciais, (nível de tolerância de 10,0%). Para isso, foram removidos 12,0 litros de água com auxílio de balões volumétricos de 2,0 litros, repondo esse mesmo volume de água nas cubas experimentais com as respectivas concentrações dos metais, partindo-se para isso de soluções estoque de 1.000,0 mg L^{-1} de $CuCl_2$ e $CdCl_2.H_2O$.

Foram procedidas, para cada tratamento, 06 amostragens de peixes, 0, 24 e 96 horas (período de duração dos ensaios de toxicidade aguda) e a cada 07 dias, tendo-se como referência o início do ensaio. Durante essas amostragens, as variáveis pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza total, amônia e teores de metais nas soluções foram determinadas.

Para tanto 06 indivíduos do tratamento controle e dos tratamentos com metais foram coletados para as determinações dos teores totais dos metais e das metalotioneínas-MTs (não faz parte deste trabalho), sendo 02 destes destinados as determinações de metais totais.

Os equipamentos utilizados para as determinações das variáveis, assim como os procedimentos de análises químicas empregados neste ensaio foram os mesmos utilizados para os testes preliminar e agudo.

Para as determinações das concentrações de metais nas soluções, utilizou-se soluções padrão de 0,0, 0,1 mg L^{-1}, 0,5 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1} e 2,0 mg L^{-1} e comprimentos de ondas (λ) e limites de detecção (LOD) para cobre e cádmio 324,7 nm; 1,51 µg L^{-1} e 228,8 nm; 1,02 µg L^{-1} respectivamente.

Para amônia, curvas analíticas de 0,0, 0,5 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1}, 2,0 mg L^{-1}, 4,0 mg L^{-1}, 6,0 mg L^{-1} e 8,0 mg L^{-1} NH_4^+ , e 0,10 mg L^{-1}, 0,25 mg L^{-1}, 0,50 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1} e 2,0 mg L^{-1} NH_4^+ foram empregadas. Nessas condições, o limite de detecção foi de 0,1 mg L^{-1}.

Uma manutenção diária foi realizada nos aquários durante todo o período experimental. As fezes e outros resíduos presentes no fundo de cada aquário foram

retirados por meio de sifonamento (Figura 10). Esse procedimento foi realizado para que não houvesse acúmulo de resíduos no fundo dos aquários, não causando dessa forma interferência nos resultados.

Os peixes amostrados foram sacrificados com auxílio de gelo, seguindo-se procedimento anteriormente descrito, conforme Figuras 13A e 13B.

4.6. Resíduos gerados

Todos os processamentos dos resíduos gerados nesta pesquisa foram baseados na Resolução CONAMA n^0 430. Em acordo com esta Resolução, “os efluentes de qualquer fonte poluidora somente podem ser lançados diretamente no corpo receptor se estiverem nas condições e padrões estabelecidos com as Normas que preconiza”.

Os resíduos gerados de cobre e cádmio, nessa pesquisa, acima de 1,0 mg L^{-1} Cu e 0,2 mg L^{-1} Cd respectivamente, padrões de lançamento estabelecidos pela Resolução, foram armazenados em tambores plásticos resistentes com capacidade de aproximadamente 40,0 L, devidamente identificados, para posterior tratamento (Figura 15).

A metodologia aplicada para o tratamento dos resíduos gerados nos experimentos baseou-se no Manual para Gerenciamento de Resíduos Perigosos da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FONSECA, 2009).

Esses foram tratados utilizando-se de soluções concentradas de hidróxidos e de sulfetos, necessários para a precipitação de cada elemento químico (Figura 16).

O destino final do precipitado resultante foi definido a critério do Laboratório de resíduos do CEA/UNESP, atendendo às prerrogativas do programa de gerenciamento de resíduos desta Instituição.

Figura 15 – Coleta e armazenamento dos efluentes gerados nos experimentos para posterior tratamento

Figura 16 – Efluentes em tambores plásticos para o processo de evaporação. Etapa inicial do processo de tratamento dos efluentes

4.6.1. Peixes gerados

Os organismos-teste utilizados nos ensaios tiveram os órgãos de interesse retirados e coletados para a presente pesquisa. Os demais resíduos da carcaça foram incinerados e tratados como resíduo sólido, atendendo às normas do programa de gerenciamento de resíduos do CEA/UNESP.

4.7. Preparo de amostras

Os organismos-teste tiveram seus comprimentos e pesos aferidos individualmente, sendo posteriormente dissecados. Dos espécimes foram removidos o fígado, as brânquias e amostras do tecido muscular, as quais foram acondicionadas sob congelamento, para que fosse determinada a bioconcentração dos metais.

Faz-se importante mencionar que as amostras de fígado, brânquias e tecido muscular foram lavadas com água desionizada previamente ao acondicionamento em congeladores como elucidado anteriormente. Este protocolo mostra-se essencial para órgãos como a brânquia, em função de sua elevada superfície de exposição.

As amostras consideradas são relativas aos ensaios preliminar, definitivo e crônico de soluções de Cu, Cd e Cu + Cd. Estas foram liofilizadas por um período de 48 horas de duração, tendo sido estimadas as porcentagens médias de umidade das mesmas para os ensaios preliminares. Exceção às amostras do experimento crônico, que foram solubilizadas a partir de amostras úmidas. Para isso, as amostras de músculo, brânquias e fígado dos dez organismos-testes de cada concentração dos ensaios preliminares foram pesadas antes e após processo de liofilização. Este procedimento foi realizado para todos os ensaios preliminares e posteriormente as porcentagens médias de umidade das amostras foram determinadas.

Para brânquias o valor médio encontrado foi de 87,15%, tecidos musculares 84,21% e fígado 71,92%, possivelmente pelo maior teor de fibras encontrado neste órgão.

A preparação das amostras dos ensaios preliminar e definitivo foi seguida por moagem criogênica, com auxílio de nitrogênio líquido, exceção às amostras do experimento crônico.

Até solubilização, as amostras moídas dos ensaios preliminar e agudo foram acondicionadas em frascos devidamente etiquetados e mantidas em dissecador, evitando-se a reabsorção de umidade e as amostras do ensaio crônico, permaneceram em congeladores devidamente etiquetadas e acondicionadas.

Após esse preparo, foram pesados aproximadamente 100,0 a 500, 0 mg de fígado, brânquias e tecido muscular de cada tratamento dos ensaios preliminar, agudo e crônico para ser realizada a digestão ácida em sistema pressurizado

através de microondas, marca Berghof, modelo Speed Wave , com capacidade para 12 frascos simultaneamente.

As amostras de músculo e brânquias foram preparadas em triplicata no caso dos ensaios preliminar e agudo e duplicata para o ensaio crônico. Em relação ao fígado, limitações para repetições foram verificadas, em função da pouca massa disponível relativa à biomassa utilizada.

4.7.1. Digestão das amostras em sistema de microondas pressurizado.

O preparo de amostras descrito abaixo foi conduzido em Forno de Microondas marca Berghof, descrito no item anterior, o qual possui estrutura de pesagem denominada “barquinha”, com capacidade de 2,0 mL. Essas unidades são inseridas em frascos de Teflon de 60,0 mL. Cada um dos 12 frascos mencionados possui controle independente de pressão e temperatura.

Os reagentes utilizados foram fabricados pela Merck em nível de grau analítico, não tendo sido efetuada purificação do ácido nítrico através de destilação em quartzo.

Para solubilização, aproximadamente de 100,0 a 500,0 mg das amostras de tecido foram introduzidos nos frascos de digestão de Teflon, com auxílio da barquinha (Figura 17).

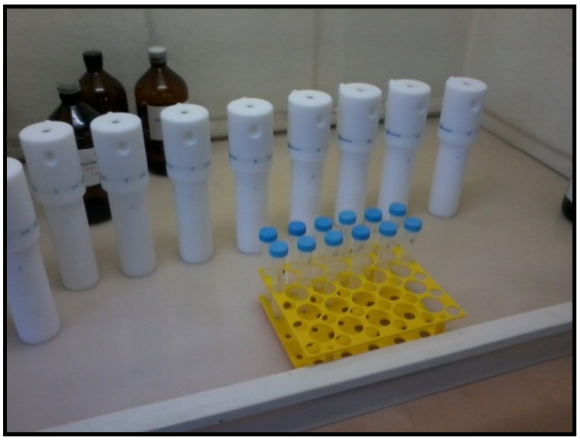

Figura 17 – Frascos de Teflon utilizados no processo de digestão das amostras de fígado, brânquias e tecidos musculares dos ensaios preliminar, agudo e crônico de Cu, Cd e Cu+Cd

Para cada digestão das amostras dos ensaios preliminar e agudo, adicionou-se aos frascos de Teflon, 4,0 mL de solução HNO_3 20% (v/v) e 1,0 mL de H_2O_2. Para as amostras de fígado, devido à pequena quantidade obtida, foram adicionados nos frascos de teflon 2,0 mL de solução HNO_3 20% (v/v) e 0,5 mL de H_2O_2.

Para as amostras dos testes crônicos adicionou-se aos frascos de Teflon contendo amostras de brânquias, fígado e tecido muscular, 4,0 mL de solução HNO_3 50% (v/v) e 1,0 mL de H_2O_2.

A programação utilizada para digestão das amostras dos ensaios preliminar, agudo e crônico está representada nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 5 – Programação utilizada para o processo de digestão das amostras dos ensaios preliminares e definitivos de Cu, Cd e Cu+Cd

STEP	°C	RAMPA (min)	PRESSÃO (bar)	TEMPO (min)	% MAGNETRON
STEP 01	170,0	10,0	35,0	5,0	80,0
STEP 02	200,0	1,0	35,0	10,0	80,0
STEP 03	50,0	2,0	35,0	1,0	0,0

Tabela 6 – Programação utilizada para o processo de digestão das amostras dos ensaios crônicos com Cu, Cd e Cu+Cd

STEP	°C	RAMPA (min)	PRESSÃO (bar)	TEMPO (min)	% MAGNETRON
STEP 01	170,0	10,0	35,0	10,0	80,0
STEP 02	200,0	1,0	35,0	20,0	80,0
STEP 03	50,0	2,0	35,0	1,0	0,0

Encerrada as digestões, as amostras foram inseridas em tubos tipo Falcon de 15,0 mL, sendo o volume completado a 10,0 mL com água desionizada. Estas foram acondicionadas a 4^0C até determinação das espécies químicas de interesse por ICP-OES marca Thermo Scientific, modelo ICAP 6000 séries. Para as amostras de fígado dos ensaios preliminar e agudo, pelas razões descritas acima em relação à limitação de amostra, o volume foi completado a 5,0 mL e para os ensaios crônicos completou-se o volume para 10,0 mL.

4.8. Bioconcentração de cobre e cádmio

As concentrações de cobre e cádmio foram determinadas no fígado, brânquias e tecidos musculares dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*.

A curva analítica para ambos os elementos foi construída com 05 pontos, 0,0 mg L^{-1}, 0,10 mg L^{-1}, 0,25 mg L^{-1}, 0,5 mg L^{-1} e 1,0 mg L^{-1}.

Os limites de detecção para as análises dos órgãos dos ensaios preliminares com cloreto de cobre e cloreto de cádmio foram respectivamente 1,55 µg L^{-1} e 1,94 µg L^{-1} e para o ensaio preliminar com cobre + cádmio foram para o cobre e cádmio respectivamente 1,05 µg L^{-1} e 1,53 µg L^{-1}.

Para os ensaios agudos os limites de detecção para o cobre e para o cádmio foram 0,81 µg L^{-1} e 1,67 µg L^{-1} e para os ensaios crônicos foram 1,33 µg L^{-1} e 0,60 µg L^{-1} respectivamente.

Todos esses limites foram estabelecidos a cada campanha analítica. Os resultados das análises de bioconcentração nos órgãos foram expressos em µg g^{-1} com base no peso úmido das respectivas amostras.

A exatidão analítica foi aferida com auxílio do material certificado de referência DORM-2, fornecido pelo National Research Council do Canadá (NRCC), onde a recuperação para o Cu foi de aproximadamente 82% e para o Cd maior que 100%.

4.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão da média. Para o cálculo da concentração letal mediana (CL_{50}) foi aplicado o programa computacional Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Aspectos do comportamento dos organismos nos ensaios preliminar, agudo e crônico

Durante os períodos experimentais diversas manifestações nos comportamentos dos organismos decorrentes das alterações ocorridas nas condições do meio puderam ser observadas.

Nos indivíduos expostos, durante os ensaios com cobre e cádmio e com a sua mistura, pode-se observar principalmente nas maiores concentrações testadas uma hipersecreção de muco na pele e nas brânquias.

Para os ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio devido à ocorrência de precipitações nas maiores concentrações, uma grande quantidade de hidróxido de cobre ficou aderida a este muco produzido pelos organismos-teste, colorindo esses tecidos em tonalidade azulada.

Em estudos realizados por Book e Neto (2000), uma acentuada produção de muco pelas brânquias de tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.) foi observada e uma grande quantidade de oxicloreto de cobre ficou envolvida pelo muco produzido pela espécie em estudo. A hipersecreção de muco nas brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos a compostos tóxicos também foi observada em estudos realizados por Lichtenfels et al. (1996). O mesmo foi constatado por Tao et al. (2000a; 2000b) expondo *Carassius auratus* e *Cyprinus carpio* a soluções de chumbo e cobre respectivamente.

De acordo com Heath (1995), a estimulação da produção de muco é um mecanismo importante de proteção como meio de reduzir a taxa de absorção desses metais através de quelação e inibição de difusão. Porém esta produção excessiva de muco pelas brânquias pode impedir a realização das trocas gasosas de forma adequada, predispondo os indivíduos à uma situação de hipóxia (LICHTENFELS et al., 1996), a qual poderá causar alterações no equilíbrio iônico dos peixes (HEATH, 1995).

Além da mortalidade, foi possível observar nas soluções com altas concentrações dos metais, sobretudo nas primeiras 24 horas, comportamentos

alterados, como que indicando o início de sintomas mais sensíveis nos organismos expostos. Este quadro foi verificado inicialmente com um estado de estresse, representando uma hiperatividade dos mesmos. Posteriormente, os movimentos se tornaram menos contínuos, caracterizando uma letargia. Porém os organismos mostraram um aumento do batimento opercular e uma busca por oxigênio na interface água-atmosfera (Figura 18).

Este comportamento de busca por oxigênio possa ser devido à presença do muco, impedindo a realização de trocas gasosas e também pela interferência dos metais no mecanismo respiratório e fisiologia dos peixes.

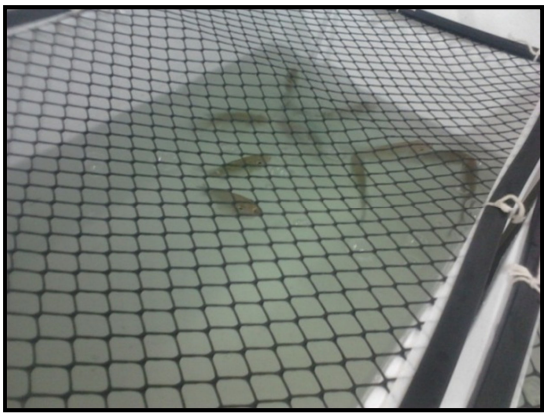

Figura 18 – Espécimes de tilápias, expostas a cobre e cádmio, na interface água-atmosfera em busca de oxigênio

A diminuição do movimento natatório nos organismos expostos às concentrações elevadas de cobre e cádmio pode ser explicada pela adaptação ao estresse, realocando energia para outros processos metabólicos, resultando em um menor dispêndio de energia para locomoção.

Ravaneli (2009), realizando estudo com um herbicida comercial composto de diuron e hexazinona para a espécie *Danio rerio*, pode constatar o mesmo comportamento do presente estudo nos organismos avaliados.

Pode-se observar, durante o período experimental, uma leve expansão do lábio inferior dos organismos expostos às concentrações mais elevadas dos metais. Acredita-se que esse acontecimento seja devido à dificuldade dos organismos em realizar trocas gasosas devido à existência do muco e a interferência dos metais no mecanismo respiratório (Figura 19).

Os sintomas descritos, quais sejam, a produção de muco junto às guelras e pele, a busca constante por oxigênio na interface água-atmosfera e o aumento do lábio inferior, foram também verificados na espécie *Colossoma macropomum* em indivíduos expostos ao cobre e ao chumbo presentes na água de formação derivada da extração de petróleo (OLIVEIRA, 2003).

Figura 19 – Leve expansão do lábio inferior observado em *Oreochromis niloticus* expostos aos metais cobre e cádmio no decorrer dos períodos experimentais

Durante os ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio pode-se observar nos organismos expostos a altas concentrações, a ocorrência de pequenas manchas avermelhadas distribuídas preferencialmente próximas às brânquias e nadadeiras laterais, características de hemorragias, assim como o contorno do lábio avermelhado (Figura 20).

Esse acontecimento pode ter ocorrido devido à rápida perda de eletrólitos causados pelo cobre. Com a depleção de sais no sangue, a água presente no plasma flui para os tecidos fazendo com que o sangue fique mais concentrado, acarretando uma hemoconcentração massiva, podendo causar hemorragias nos organismos expostos a esse metal, como genericamente explicado no parágrafo anterior. Segundo Wilson e Taylor (1993a e 1993b, revisto por HANDY; EDDY; BAINES, 2002), o coração é submetido a esforço excessivo, quando do bombeamento do sangue viscoso.

Figura 20 – Contorno avermelhado do lábio de *Oreochromis niloticus* expostos a altas concentrações de cobre+cádmio

5.2. Ensaio preliminar com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Os ensaios preliminares com os sais cloreto de cobre ($CuCl_2$), cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) e cloreto de cobre ($CuCl_2$) + cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$), tiveram como objetivo estabelecer os limites de concentrações a serem empregadas nos ensaios definitivos desses metais. Para isso, as porcentagens de mortalidade ocorrida nesses testes preliminares foram consideradas, onde o critério de determinação das concentrações a serem avaliadas nos ensaios agudos das referidas espécies químicas foi estabelecido conforme recomendações da ABNT, 2004 (Norma 15.088).

Essas concentrações ficaram compreendidas entre a maior concentração nominal do agente tóxico que não causou letalidade (CENO), e a menor concentração nominal do agente tóxico, que causou letalidade a 100% dos organismos durante os testes preliminares (CEO).

As mortalidades dos organismos para os ensaios com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ no período experimental de 48 horas, apresentadas em porcentagem, encontram-se dispostas na Figura 21.

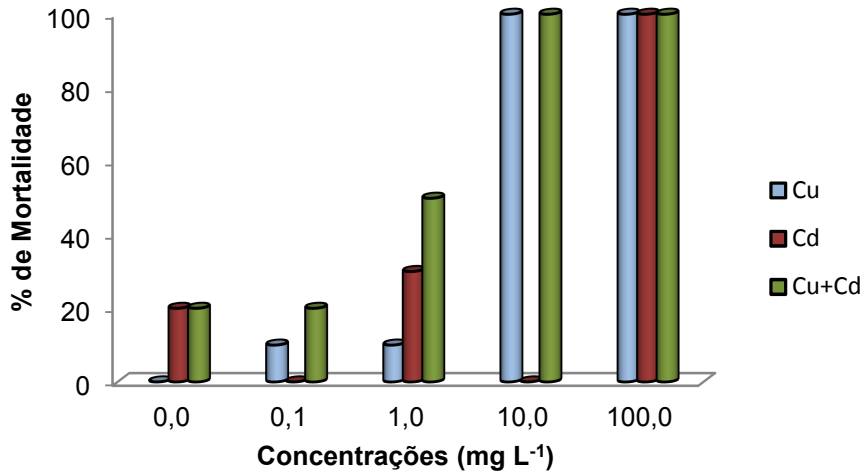

Figura 21 - % de óbitos em tilápias (*Oreochromis niloticus*), em um período de 48 horas para os testes preliminares com as soluções de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Para os ensaios preliminares com $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2$ em um período de 48 horas de experimentação ocorreram 100% de mortalidade dos organismos-teste nas duas maiores concentrações testadas (10,0 e 100,0 mg L^{-1}); para o ensaio com $CdCl_2$, a concentração que causou 100% de mortalidade nos organismos-teste em um período de 48 horas foi apenas a de 100,0 mg L^{-1}.

No ensaio com cloreto de cobre, a sobrevivência nos controles foi igual a 100% para todo o período experimental; para os testes com cloreto de cádmio e com cloreto de cobre + cloreto de cádmio, quando o período de 48h for considerado, ocorreu 80% de sobrevivência. Desta forma, os óbitos observados no controle não ultrapassaram a 20% ao final de 48 horas. Segundo Klemm et al. (1994) esta porcentagem de mortalidade no grupo controle é considerada aceitável em testes de toxicidade de curta duração.

No intervalo de 0,1 a 1,0 mg L^{-1} ocorreram as menores porcentagens de mortalidade nos ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio, sendo 10% de óbitos no ensaio com $CuCl_2$ para as duas concentrações e 20% e 50% no ensaio com $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ para a primeira e segunda concentração respectivamente, em um período de 48 horas de experimentação. No caso do experimento com $CuCl_2$ não se tem uma explicação para os resultados observados serem iguais nas diferentes concentrações, distintas em uma ordem de magnitude. Talvez a observação das % de mortalidades verificadas nos tratamentos

controles possa explicar esta aparente incoerência. Ou seja, mesmo com a ausência de agente químico, diferentes porcentagens de mortalidade foram constatadas.

Para o teste com cloreto de cádmio a concentração que resultou em maiores % de mortalidade foi a de 1,0 mg L^{-1} com 30% de óbitos. Nas concentrações 0,1 e 10,0 mg L^{-1} observou-se 100% de sobrevivência nos organismos-teste. Os óbitos ocorridos na concentração de 1,0 mg L^{-1} deve-se ao estresse que os organismos estavam sofrendo por causa do processo de hierarquia dominante que estava acontecendo nos aquários. Esse tipo de comportamento em tilápias pode inviabilizar seu uso como organismo teste, sobretudo em experimentos de toxicidade crônica, com período de duração estendido. Uma forma de reduzir este quadro pode estar na seleção mais criteriosa da homogeneidade da população.

Os resultados de mortalidade apresentados mostraram que os tratamentos com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio foram mais agressivos para a espécie estudada do que com cloreto de cádmio, revelando a menor toxicidade do cádmio frente ao cobre e aos metais em conjunto. Essa informação foi confirmada com os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, a ser descrito adiante neste texto.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam o intervalo de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido), as quais foram monitoradas diariamente, para os ensaios preliminares com as soluções de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$.

Tabela 7 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CuCl_2$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	24,05±0,07 - 25,05±0,08	6,87±0,04 - 7,29±0,10	7,62±1,05 - 10,72±1,10
0,1 mg L^{-1}	24,02±0,03 - 25,01±0,01	6,91±0,06 - 7,23±0,04	9,00±1,10 - 11,95±0,15
1,0 mg L^{-1}	24,02±0,03 - 25,05±0,07	6,99±0,07 - 7,21±0,01	8,71±0,18 - 10,00±0,11
10,0 mg L^{-1}	24,05±0,07 - 25,02±0,03	6,48±0,01 - 7,08±0,05	9,02±0,28 - 10,18±0,11
100,0 mg L^{-1}	24,04±0,06 - 25,02±0,03	5,49±0,12 - 6,29±0,07	9,97±0,76 - 10,67±0,26

Tabela 8 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CdCl_2.H_2O$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	26,10±0,00 - 26,40±0,00	6,67±0,01 - 6,76±0,09	5,20±0,01 - 8,13±0,42
0,1 mg L^{-1}	25,95±0,07 - 26,35±0,07	6,65±0,01 - 6,82±0,02	6,27±0,54 - 7,73±0,05
1,0 mg L^{-1}	25,70±0,00 - 26,30±0,00	6,59±0,04 - 6,98±0,05	6,77±0,25 - 9,25±0,17
10,0 mg L^{-1}	25,80±0,00 - 26,25±0,07	6,51±0,13 - 7,06±0,05	7,99±0,21 - 9,95±0,19
100,0 mg L^{-1}	26,00±0,00 - 26,45±0,07	6,31±0,17 - 7,10±0,04	8,27±0,22 - 10,65±0,33

Tabela 9 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24 e 48 horas de experimentação do ensaio preliminar com $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	24,18±0,04 - 25,49±0,01	6,73±0,01 - 7,04±0,01	8,14±0,45 - 9,35±0,38
0,1 mg L^{-1}	24,20±0,07 - 25,38±0,07	6,85±0,11 - 7,01±0,03	7,77±0,41 - 8,67±0,12
1,0 mg L^{-1}	24,10±0,00 - 25,28±0,04	6,88±0,08 - 7,11±0,02	8,00±0,79 - 8,89±0,24
10,0 mg L^{-1}	24,15±0,00 - 25,25±0,04	6,37±0,07 - 6,93±0,02	6,78±0,95 - 8,84±0,06
100,0 mg L^{-1}	24,34±0,05 - 25,29±0,03	5,45±0,11 - 6,69±0,05	8,22±0,08 - 9,25±0,08

A temperatura nos ensaios preliminares com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ ficou compreendida entre 25°C±1,0, o oxigênio dissolvido permaneceu no intervalo entre 5,20 mg L^{-1} a 11,95 mg L^{-1} e o pH entre 5,45 a 7,29.

Em relação ao pH, para os ensaios com $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2$, observa-se uma acentuada tendência de diminuição desta variável com o aumento da concentração dos metais nas cubas experimentais. Esse fenômeno pode estar ocorrendo devido à precipitação dos metais na forma de hidróxidos, cujas constantes de dissociação são significativamente diferentes, sendo de 4,4 10^{-15} para o Cd e 1,6 10^{-19} para o Cu. Corroboram ainda para essas respostas, os excretas metabólicos e a degradação da matéria orgânica. Contudo, nos experimentos preliminares, o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido mantiveram-se sem variações significativas, tanto entre as diferentes concentrações quanto entre as respectivas réplicas, reduzindo assim a possibilidade de mortalidade devido a variações bruscas na qualidade físico-química da água utilizada nos testes durante o período de 48 horas.

A dureza total da água nos tratamentos controle dos ensaios preliminares com os sais cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio foram 84,3 ± 0,14; 70,0 ± 0,56 e 68,54 ± 0,25 mg L^{-1} $CaCO_3$ respectivamente. Essas variações podem ser explicadas pelo fato de a água ser fornecida pela ETA, amostrada em períodos diferentes. Observa-se, contudo maior similaridade para os ensaios relativos aos tratamentos controle com o Cd isoladamente e quando em combinação com os dois metais. De certa forma, a % mortalidade de 20% acompanhou as situações em que as durezas foram semelhantes e com a dureza mais elevada, de 84,3 mg L^{-1}, a % de mortalidade foi nula.

A aferição da dureza total apenas nos controles deve-se, como elucidado anteriormente, à interferência dos metais presentes nas soluções, os quais interferem positivamente nesta variável. Isto ocorre devido à constante de formação Cu^{2+}-EDTA e Cd^{2+}-EDTA ser maior que a constante de formação do Ca^{2+}-EDTA, sendo respectivamente 18,80; 16,46 e 10,70. Assim a visualização do ponto de viragem da cor rósea para azul fica prejudicada devido à ligação metal-EDTA ser mais forte que à ligação Ca^{2+}-EDTA.

Os valores da dureza total nos ensaios preliminares não se mostraram de acordo com os recomendados pela ABNT (Norma 15088), uma vez que esta recomenda um intervalo compreendido entre 40,0 mg L^{-1} $CaCO_3$ a 48,0 mg L^{-1} $CaCO_3$.

Mesmo estando acima do intervalo de concentrações estabelecido pela ABNT, às durezas obtidas nos ensaios acima não causaram interferências na toxicidade dos metais avaliados, pois são classificadas como águas moles a moderadamente dura de acordo com Zagatto e Bertoletti (2008), uma vez que em águas consideradas duras, os cátions Mg^{+2} e Ca^{+2} competem com os metais pelos sítios ativos de ligação no interior dos organismos (NOGAMI et al., 2000).

As Figuras 22, 23 e 24 indicam as concentrações obtidas dos metais nas soluções em função do tempo para os ensaios preliminares de cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio.

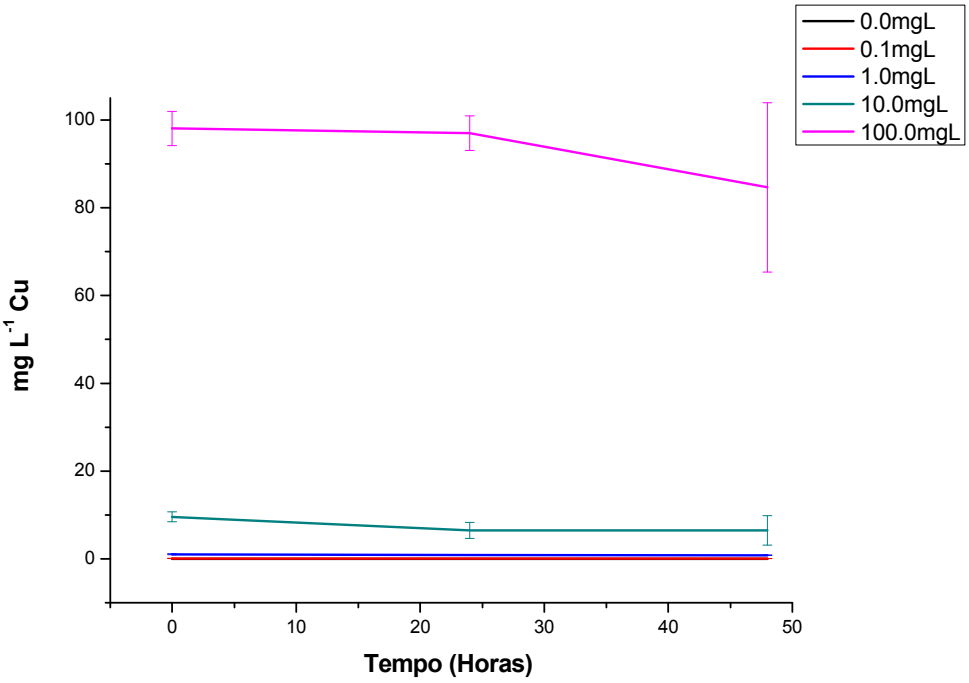

Figura 22 – Variação da concentração de cobre (mg L^{-1} Cu) presente na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com $CuCl_2$ durante ensaio preliminar

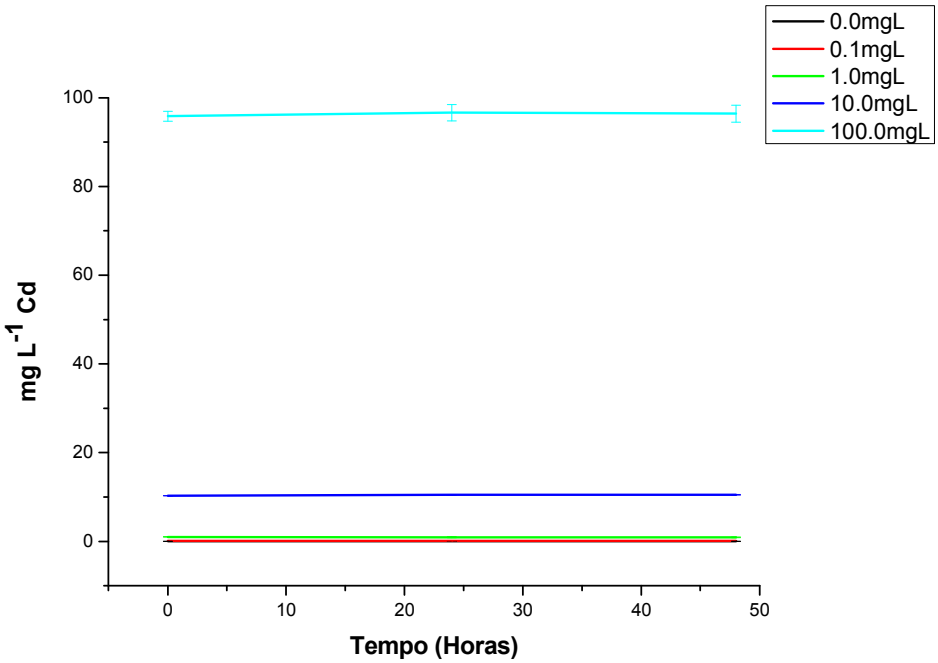

Figura 23 - Variação da concentração de cádmio (mg L^{-1} Cd) presente na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com $CdCl_2.H_2O$ durante ensaio preliminar

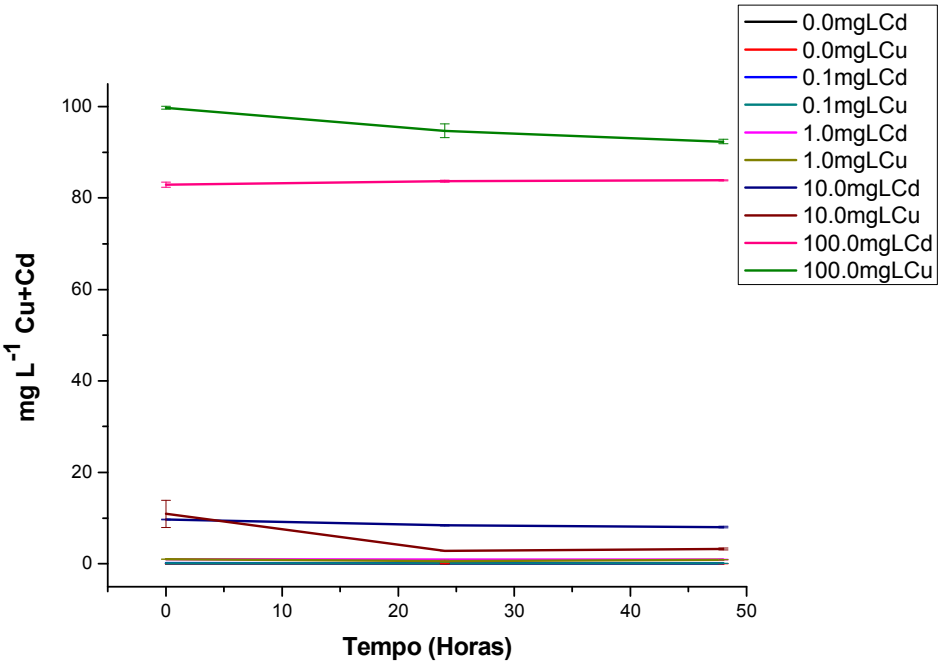

Figura 24 - Variação das concentrações de cobre e cádmio (mg L^{-1} Cu+Cd) presentes na solução ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos com esses sais durante ensaio preliminar.

Nas concentrações de 10,0 mg L^{-1} e 100,0 mg L^{-1} dos ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio, houve um decréscimo acentuado da concentração de Cu^{2+} em função do tempo para as duas concentrações, sendo o Cu reduzido desde a amostragem inicial para a concentração mais elevada. Leve precipitação de Cd ocorreu na concentração de 10 mg L^{-1} quando considera-se a mistura dos metais. Isso deve-se a uma precipitação desse metal durante o período experimental de 48 horas (Figuras 22 e 24).

O mesmo não foi observado para o ensaio com cloreto de cádmio, uma vez que as concentrações dos metais na solução mantiveram-se estáveis durante todo o período experimental (vide Figura 23).

Esse fato deve-se aos produtos de solubilidade desse metal, onde o Kps do hidróxido de cobre ($Cu(OH)_2$) é relativamente menor do que o Kps do hidróxido de cádmio ($Cd(OH)_2$). A seguir as equações referentes aos produtos de solubilidade para os hidróxidos de cobre e cádmio.

$$1{,}6.10^{-19} = \frac{[\mathrm{Cu}].[\mathrm{OH}]^2}{\mathrm{Cu}.(\mathrm{OH})_2}$$

$$4{,}4.10^{-15} = \frac{[\mathrm{Cd}].[\mathrm{OH}]^2}{\mathrm{Cd}.(\mathrm{OH})_2}$$

Figura 25 – Fotografia ilustrativa do precipitado de cobre formado nas cubas experimentais, nas concentrações de 10 e 100 mg L^{-1} Cu e 10 e 100 mg L^{-1} Cu + Cd, durante o ensaio preliminar. Na situação com a presença simultânea dos dois metais, constatou-se a ocorrência de co-precipitação de Cd, induzida pelo Cu

Quando misturados, o fenômeno de precipitação é verificado para ambos os elementos. O caso mais típico de precipitação nessa situação, pode ser constatado na concentração de 10,0 mg L^{-1} onde observa-se precipitação tanto do cobre quanto do cádmio (vide Figura 24).

Pode-se afirmar que o Cd foi co-precipitado com o Cu, sendo que este último na presença de cádmio apresentou maior facilidade de precipitação na concentração de 10 mg L^{-1} do que isoladamente. Com os valores de pH do meio variando entre 5,45 a 7,29, houve um favorecimento da precipitação desses metais, pois de acordo com Çoğun e Kargin (2004) altos valores de pH contribuem para a diminuição da solubilidade de cobre na solução, conforme dados apresentados acima neste texto.

Nas demais concentrações dos ensaios preliminares ocorreram apenas um leve decréscimo dos metais nas soluções em função do tempo. Isso pode ser atribuído a uma perda por bioconcentração dos mesmos pelos organismos e por outras possíveis perdas, como adsorção às paredes das unidades experimentais.

5.3. Ensaio agudo com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Após os resultados dos testes preliminares, as concentrações a serem testadas nos ensaios de toxicidade aguda com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio utilizando como organismos testes *Oreochromis niloticus*, foram determinadas.

Para o cobre e a mistura dos dois metais, as concentrações empregadas nos testes definitivos foram estabelecidas como: 0,0 (Controle); 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L^{-1} Cu e Cu+Cd e para o cádmio foram 0,0 (Controle); 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 mg L^{-1} Cd.

Essas concentrações foram baseadas nos resultados de mortalidade encontrada nos ensaios preliminares, onde o critério de estabelecimento das mesmas encontra-se descrito no item 5.2.

A porcentagem de mortalidade dos organismos durante o período experimental de 96 horas dos ensaios agudos, em função das concentrações de $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ estão apresentadas nas Figuras 26 e 27.

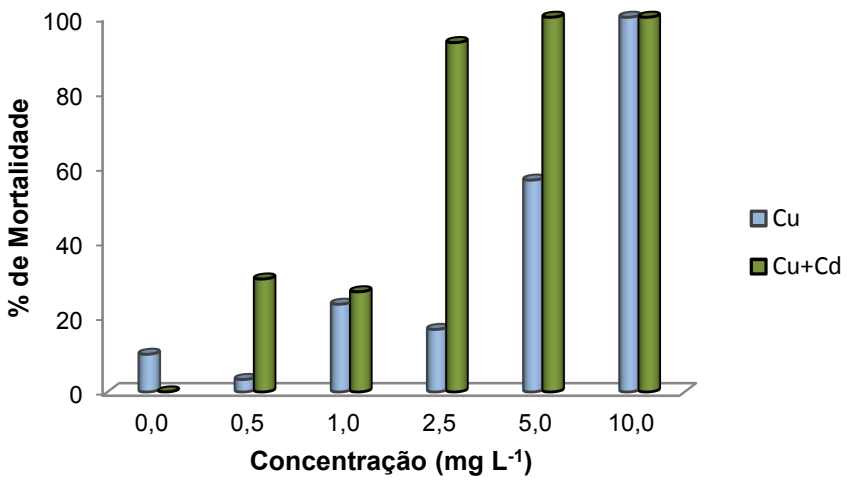

Figura 26 - Mortalidade (%) dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*, considerando o período experimental de 96 horas, em função da concentração do metal no teste agudo com $CuCl_2$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

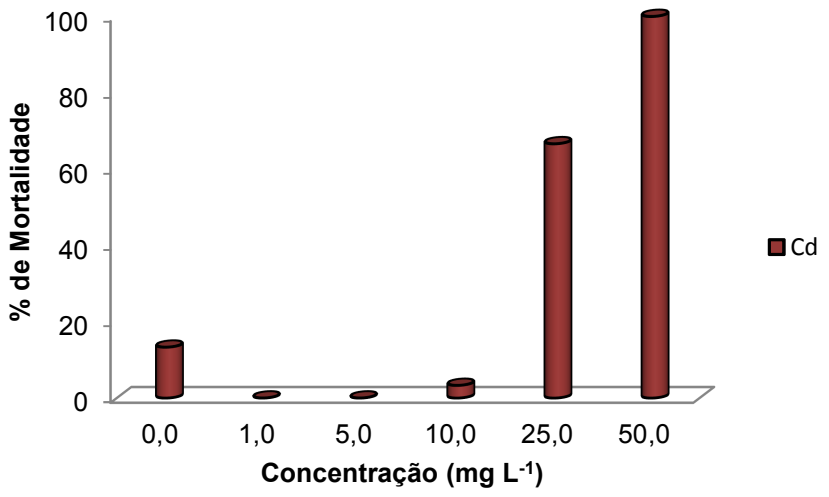

Figura 27 - Mortalidade (%) dos organismos-teste, *Oreochromis niloticus*, considerando o período experimental de 96 horas, em função da concentração do metal no teste agudo com $CdCl_2.H_2O$

As maiores porcentagens de mortalidade dos organismos nos ensaios agudos com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio foram verificadas nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L^{-1} para o ensaio com $CuCl_2$, onde apenas na última concentração ocorreu 100% de mortalidade, e 2,5; 5,0 e 10,0 mg L^{-1} para a mistura cloreto de cobre + cloreto de cádmio, morrendo 100% dos organismos na penúltima e na última concentração testada, evidenciando a potencialização tóxica dos metais quando simultaneamente presentes no meio.

Para o ensaio agudo com cloreto de cádmio observou-se que apenas na maior concentração testada, 50,0 mg L^{-1}, fora atingida a marca de 100% de mortalidade dos organismos-teste em 96 horas de experimentação.

Quando se considera a menor porcentagem de óbitos nos ensaios agudos, observa-se certa dificuldade em se estabelecer as menores concentrações, onde nenhum efeito tóxico tenha sido verificado. Por exemplo, no ensaio com $CuCl_2$, 10% de mortalidade foi verificada no tratamento controle, ao passo que uma taxa inferior a esta (3%), ocorreu no tratamento com 0,5 mg L^{-1}. Ainda considerando-se este mesmo metal, fato semelhante ocorre para as concentrações de 2,5 mg L^{-1}, com 16,6% de mortandade e com 1,0 mg L^{-1}, com 23,3%. Outras ocorrências similares podem ser observadas, como no caso do ensaio com $CdCl_2.H_2O$, onde o tratamento controle apresentou 13% de mortalidade e o tratamento com 10,0 mg L^{-1}, com

somente 3,3%. No caso da combinação dos dois metais isso também foi verificado, onde 26,6% de mortandade ocorreu no tratamento 1,0 mg L^{-1} e 30% em concentração igual à metade deste valor.

Esse quadro pode ser considerado como resposta típica de um ensaio biológico, onde inúmeras variáveis encontram-se envolvidas em um resultado final. Há que se salientar, conforme já descrito acima, que as taxas de mortalidade dos tratamentos controles estiveram perfeitamente dentro dos limites aceitáveis para este tipo de experimento (KLEMM et al., 1994). A observação experimental mostrou que o comportamento hierárquico da tilápia é determinante para este quadro, pois trata-se de um organismo agressivo e predador da própria espécie. Essa tendência tende a ser significativa com o tempo, pois animais mantidos em cativeiro apresentam elevada variação de peso, devido à predominância de alguns indivíduos sobre outros. Além disso, durante os ensaios observou-se que alguns indivíduos saltavam dos aquários durante a noite, não importando o tratamento a que foram submetidos.

Os resultados de mortalidade apresentados mostraram que os ensaios com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio exibiram maior toxicidade à espécie em estudo quando comparado ao ensaio com cloreto de cádmio, reforçando a validade dos ensaios preliminares discutidos anteriormente. Esta tendência pode ser confirmada pelas concentrações letais médias (CL_{50}) encontradas no período de 96 horas para os ensaios agudos com os referidos metais, as quais são apresentadas a seguir.

Com base nas porcentagens de mortalidade obtidas em cada uma das concentrações dos ensaios agudos com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio, as $CL_{50\text{-}96h}$ foram estimadas utilizando-se o método estatístico Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Através deste protocolo, as concentrações letais médias encontradas foram 3,53 mg L^{-1} com intervalo de confiança de 95% de 2,82 mg L^{-1} até 4,42 mg L^{-1}; 20,13 mg L^{-1} com intervalo de confiança de 95% de 17,36 mg L^{-1} até 23,34 mg L^{-1} e 1,36 mg L^{-1} com intervalo de confiança de 95% de 1,06 mg L^{-1} até 1,73 mg L^{-1} para os ensaios com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio respectivamente.

Nas Figuras 28, 29 e 30 está apresentada a forma gráfica da $CL_{50\text{-}96h}$, utilizada nos ensaios de toxicidade aguda com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio respectivamente.

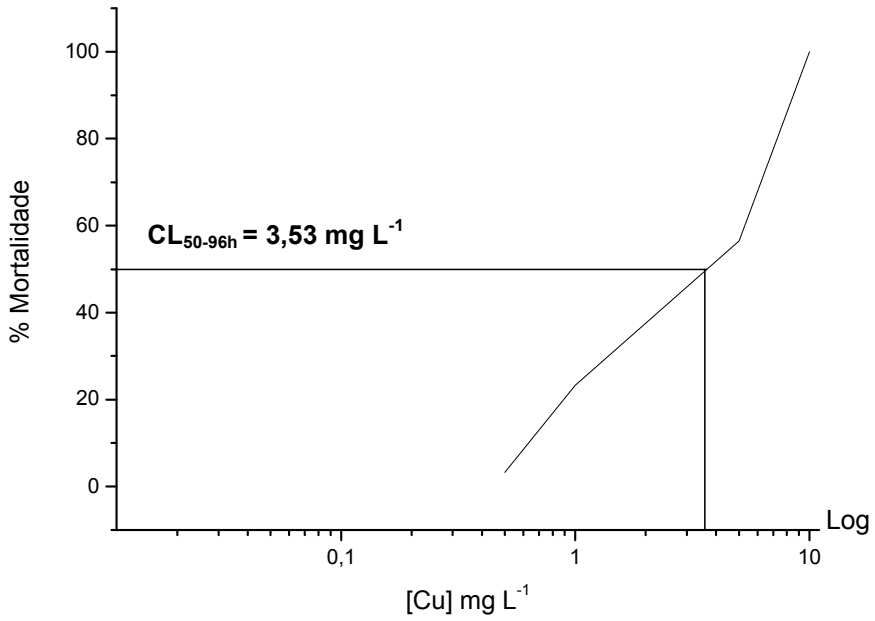

Figura 28 – $CL_{50\text{-}96h}$ (mg L^{-1}) para cobre, calculada através do ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre ($CuCl_2$)

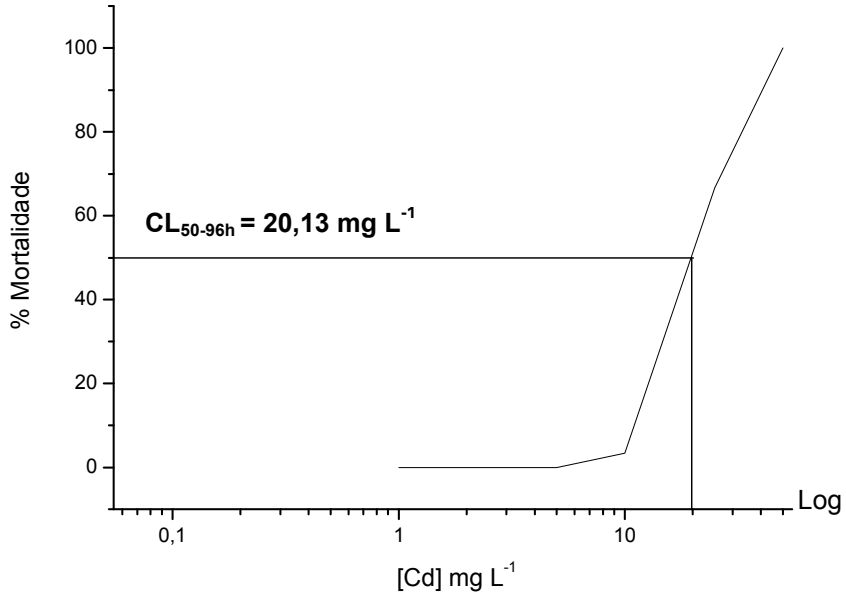

Figura 29 – $CL_{50\text{-}96h}$ (mg L^{-1}) para o cádmio, relativa ao ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$)

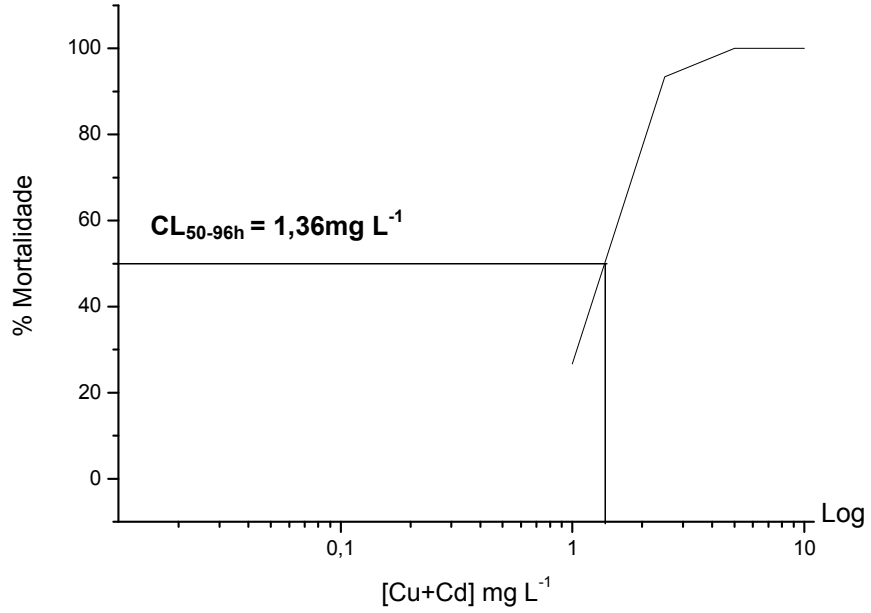

Figura 30 – $CL_{50\text{-}96h}$ (mg L^{-1}) para a mistura dos metais cobre+cádmio estimada através do ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre ($CuCl_2$) + cloreto de cádmio ($CdCl_2.H_2O$)

Garcia-Santos, Fontainhas-Fernandes e Wilson (2006) estimaram a $CL_{50\text{-}96h}$ de cádmio para *Oreochromis niloticus*, como 14,8 mg L^{-1} Cd, utilizando dureza total de 50 mg L^{-1} $CaCO_3$. Os autores afirmam que essa espécie não se mostra adequada como bioindicadora para a avaliação da toxicidade subletal de cádmio devido à alta tolerância da espécie a esse metal, mas que certamente pode contribuir significativamente para o entendimento do mecanismo em que a toxicidade do Cd se manifesta em organismos aquáticos.

Almeida et al. (2001) determinaram a $CL_{50\text{-}96h}$ do Cloreto de Cádmio ($CdCl_2$) em *Oreochromis niloticus* e o valor apresentado pelos autores foi 18,58 mg L^{-1}. Pode-se observar que este valor aproxima-se daquele encontrado no presente trabalho, que foi de 20,13 mg L^{-1}.

Boock e Neto (2000), realizando estudos com a tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*), encontraram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para o fungicida oxicloreto de cobre de 129,21 mg L^{-1}, correspondendo a 76,91 mg L^{-1} de cobre metálico.

Estudos realizados por Seddek[2] (1990 apud BOOK; NETO, 2000, p.217) utilizando como espécie bioindicadora a *Oreochromis niloticus* relataram uma CL_{50} de 31,9 mg L^{-1} de sulfato de cobre, correspondendo a 7,98 mg L^{-1} de cobre metálico. Este estudo se comparado ao trabalho citado anteriormente de Garcia-Santos, Fontanhas-Fernandes e Wilson (2006) e Almeida et al. (2001) ilustra a menor toxicidade e portanto mais tolerância ao cádmio para a espécie em questão quando comparada ao cobre.

Valor aproximado de $CL_{50\text{-}72h}$ do sulfato de cobre para *Oreochromis niloticus* de 40,6 mg L^{-1} foi encontrado por Mohamed et al. (2008). Os autores também observaram que nos grupos tratados com cobre, houve uma redução da atividade mitótica quando comparado com o grupo controle, concluindo que o cobre pode causar alterações no DNA. Contudo, evidencia-se assim a importância do tempo de exposição na toxicidade, 25% inferior ao adotado em nossa pesquisa.

Lam et al. (1998) expuseram espécies de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e de tilápia (*Tilapia mossambica*) a cobre e zinco com o intuito de determinar os valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para ambas as espécies de metais. Os autores encontraram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ do cobre para a tilápia de 1,52 mg L^{-1} e 24,3 mg L^{-1} para carpa comum. O valor encontrado de $CL_{50\text{-}96h}$ para esta espécie para o Cu sendo igual a menos da metade do que determinamos para a tilápia do Nilo, de 3,53 mg L^{-1}. O trabalho destes autores demonstra também ser o Zn uma ordem de magnitude menos tóxico do que o Cu.

Masutti et al. (2006) estudaram a sensibilidade de *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes* a cobre e cromo. Os autores determinaram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para o cobre e para a espécie *Oreochromis niloticus* variando de 0,32 mg L^{-1} a 0,65mg L^{-1} e concluíram que ambas as espécies apresentaram maior sensibilidade ao cobre do que ao cromo.

Gomes et al. (2009) avaliando a toxicidade do $CuSO_4.5H_2O$ e $CdCl_2.H_2O$ para piauçú (*Leporinus macrocephalus*), e curimatã (*Prochilodus vimboides*), encontraram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ para cobre de 0,047 e 0,090 mg L^{-1} e para cádmio de 3,16 e 7,42 mg L^{-1} para curimatã e piauçú, respectivamente. Esse estudo ilustra que, à

[2] SEDDEK, A. Acute toxicity studies of the molluscide copper sulfate ($CuSO_4$) on some nile fish. **Assiut Veterinary Medical Journal**, Assiut, Egypt, v. 23, n. 45, p. 166-175, 1990.

semelhança do presente estudo, o cobre mostrou-se mais tóxico para as espécies em estudo para um período experimental de 96 horas.

O mesmo pode ser observado por Witeska et al. (2010) onde puderam avaliar concentrações de $CL_{50\text{-}96h}$ de cobre e cádmio para *Cyprinus carpio L.* de 2,0 mg L^{-1} e 6,5 mg L^{-1} respectivamente.

Lloyd (1992) destaca a atenção recebida pelo cobre na comunidade científica, uma vez que este metal é considerado o mais tóxicos para diferentes espécies de peixes.

Os estudos citados anteriormente e os resultados apresentados pelo trabalho em questão mostram que a espécie *Oreochromis niloticus* é mais sensível ao cobre e a mistura dos dois metais do que ao cádmio. Esse dado é justificado pela maior taxa de mortalidade e consequentemente pelos baixos valores de $CL_{50\text{-}96h}$ ocorridos nos experimentos com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio do que nos ensaios com cloreto de cádmio.

Nas Tabelas 10, 11 e 12 estão apresentadas o intervalo das variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) monitoradas diariamente durante as 96 horas dos ensaios de toxicidade aguda com as soluções $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ respectivamente.

Tabela 10 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CuCl_2$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	25,40±0,09 - 25,70±0,13	6,92±0,06 - 7,51±0,11	7,71±0,47 - 8,43±0,37
0,5 mg L^{-1}	25,23±0,05 - 25,50±0,00	6,92±0,29 - 7,14±0,03	7,86±0,18 - 8,83±0,29
1,0 mg L^{-1}	25,37±0,06 - 25,59±0,03	6,87±0,14 - 7,21±0,03	8,03±0,17 - 8,62±0,73
2,5 mg L^{-1}	25,38±0,12 - 25,64±0,08	6,74±0,55 - 7,24±0,05	7,94±0,71 - 8,40±0,51
5,0 mg L^{-1}	25,43±0,06 - 25,77±0,04	7,09±0,03 - 7,57±0,24	7,58±0,11 - 8,01±0,27
10,0 mg L^{-1}	25,48±0,03 - 25,87±0,02	6,75±0,10 - 7,74±0,07	7,98±0,24 - 8,67±0,24

Tabela 11 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CdCl_2.H_2O$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	23,77±0,01 - 25,11±0,05	6,62±0,10 - 7,29±0,05	6,95±0,04 - 8,00±0,19
1,0 mg L^{-1}	23,66±0,09 - 25,16±0,04	6,76±0,10 - 7,16±0,02	7,02±0,06 - 7,98±0,15
5,0 mg L^{-1}	23,57±0,01 - 25,36±0,09	6,76±0,08 - 7,20±0,09	6,77±0,17 - 8,28±0,45
10,0 mg L^{-1}	23,65±0,07 - 25,41±0,11	6,91±0,05 - 7,12±0,02	7,11±0,11 - 8,10±0,25
25,0 mg L^{-1}	23,80±0,04 - 25,50±0,07	6,68±0,08 - 7,13±0,10	7,10±0,15 - 8,14±0,17
50,0 mg L^{-1}	24,00±0,09 - 25,48±0,08	6,64±0,03 - 7,18±0,08	7,44±0,06 - 7,90±0,02

Tabela 12 – Intervalo de valores obtidos de variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), em cada concentração testada, monitoradas no período inicial e após 24, 48, 72 e 96 horas de experimentação do ensaio agudo com $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	24,19±0,11 - 25,50±0,00	7,20±0,10 - 7,47±0,06	7,47±0,04 - 8,13±0,32
0,5 mg L^{-1}	24,28±0,06 - 25,49±0,10	7,07±0,15 - 7,47±0,12	7,57±0,50 - 8,56±0,20
1,0 mg L^{-1}	24,28±0,04 - 25,35±0,03	7,23±0,06 - 7,60±0,00	7,35±0,13 - 8,14±0,14
2,5 mg L^{-1}	24,39±0,01 - 25,44±0,03	7,10±0,10 - 7,47±0,06	7,06±0,92 - 8,07±0,15
5,0 mg L^{-1}	24,56±0,10 - 25,53±0,11	6,97±0,21 - 7,53±0,06	7,32±0,48 - 8,36±0,48
10,0 mg L^{-1}	24,71±0,04 - 25,64±0,07	6,80±0,00 - 7,33±0,06	7,42±0,48 - 8,13±0,09

A temperatura nos ensaios definitivos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ ficou compreendida entre 24°C±1, o pH entre 6,62 a 7,74, e o oxigênio dissolvido permaneceu no intervalo entre 6,77 mg L^{-1} a 8,83 mg L^{-1}.

Em todos os experimentos definitivos realizados, as variáveis pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido mantiveram-se sem variações significativas nas diferentes concentrações, reduzindo assim a possibilidade de mortalidade devido a variações bruscas nas qualidades físico-químicas da água utilizada nos testes durante o período de 96 horas.

A dureza total aferida apenas nos tratamentos controles, conforme esclarecido anteriormente, nos ensaios com cobre, cádmio e cobre+cádmio foi respectivamente 81,88 ± 1,64; 76,85 ± 4,34 e 66,13 ± 2,76 mg L^{-1} $CaCO_3$. Essa variação, assim como aconteceu nos ensaios preliminares, pode ser explicada pelo fato de a água ser fornecida pela ETA e amostrada em períodos diferentes.

Da mesma maneira como ocorrido nos ensaios preliminares, os valores da dureza total para os ensaios agudos não se mostraram de acordo com os recomendados pela ABNT (Norma 15.088), uma vez que esta recomenda um intervalo compreendido entre 40,0 mg L^{-1} $CaCO_3$ a 48,0 mg L^{-1} $CaCO_3$. Porém, mesmo acima do intervalo de concentrações estabelecido pela ABNT, às durezas obtidas nos ensaios acima não causaram interferências na toxicidade dos metais avaliados, pois são classificadas de acordo com Zagatto e Bertoletti (2008) como águas moles a moderadamente dura, uma vez que apenas águas consideradas duras interferem na toxicidade dos metais por meio da competição entre os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} pelos sítios ativos no interior dos organismos expostos (NOGAMI et al., 2000).

Como controle de qualidade da água, a variável amônia, por apresentar toxicidade em função da concentração e depender entre outras coisas da relação massa/volume, foi determinada diariamente durante o período do ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio e os resultados estão apresentados nas Figuras 31, 32 e 33.

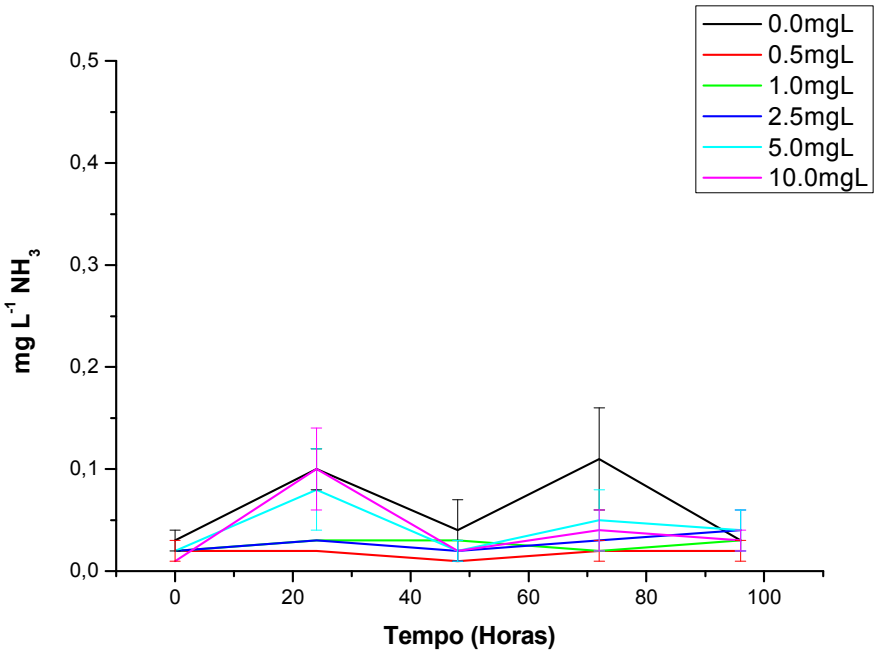

Figura 31 - Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CuCl_2$

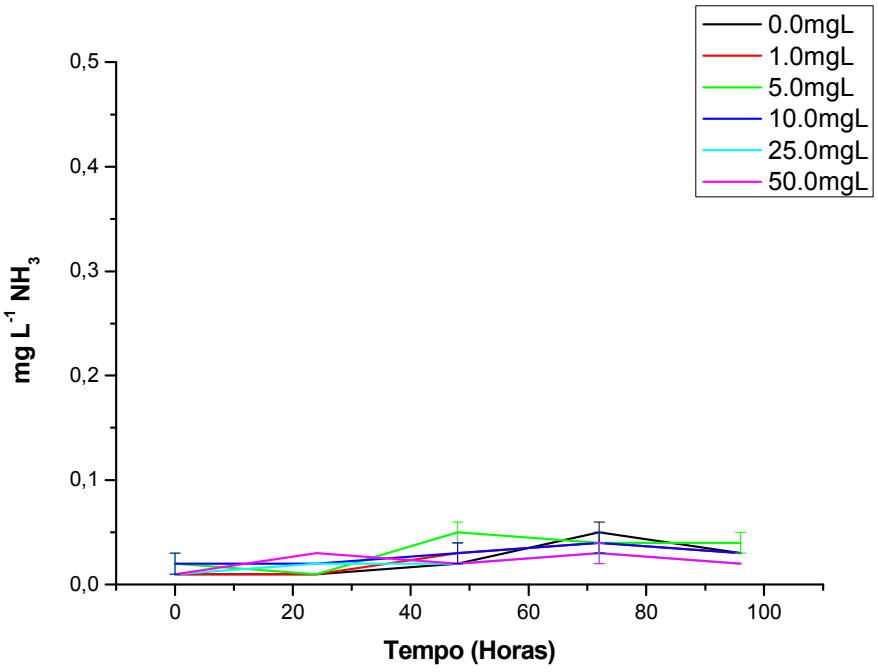

Figura 32 - Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CdCl_2.H_2O$

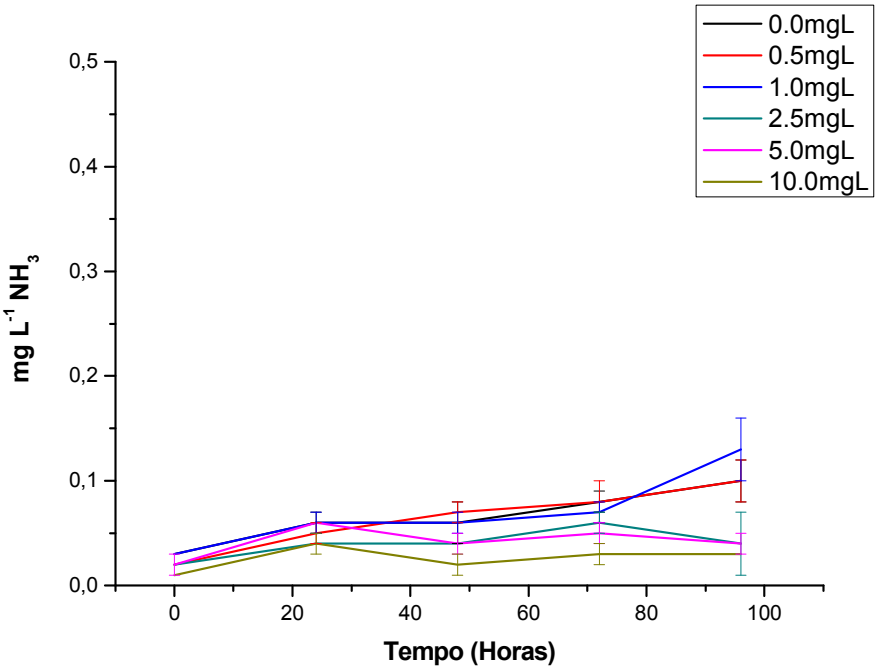

Figura 33 - Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) em função do tempo para o ensaio agudo com $CuCl_2$ + $CdCl_2.H_2O$

A partir da observação das Figuras 31, 32 e 33 pode-se verificar que a amônia durante o período experimental de 96 horas ficou compreendida entre 0,01 e 0,13 mg L^{-1} NH_3.

No ensaio com o cloreto de cobre, observa-se que o valor desta variável para o tratamento controle (0,0 mg L^{-1}) apresenta-se, por praticamente todo o período experimental, mais elevado do que para os outros tratamentos em questão e para os outros ensaios realizados, exceção dada a concentração de 10,0 mg L^{-1} nas primeiras 24 horas para o ensaio com $CuCl_2$.

Esse fato pode ser atribuído ao estresse que os organismos estavam passando em decorrência do processo de dominância hierárquica existente entre essa espécie durante todo o ensaio, devido o lote não ter sido relativamente homogêneo.

De acordo com Randall e Tsui (2002), o estresse resulta em um aumento no nível de cortisol no organismo estressado, estimulando a glicogênese e gliconeogênese, assim como o catabolismo de proteínas, aumentando dessa forma produção de amônia no plasma e consequentemente sua excreção.

Em um período de 24 horas, nos tratamentos de 10,0 mg L^{-1} e 5,0 mg L^{-1} do ensaio com cloreto de cobre e cloreto de cobre + cloreto de cádmio, pode-se observar a existência de um pico nos valores de amônia, seguido de uma diminuição do mesmo ao final de 96 horas. Essas variações positivas nos valores, seguido pela sua diminuição estão relacionados respectivamente à exposição dos organismos a elevadas concentrações dos metais e a mortalidade ocorrida nos mesmos.

Em adição, pode-se notar um acréscimo nos valores dessa variável com o passar do período de exposição. Esse fato deve-se ao aumento do estresse dos organismos expostos aos metais durante todo o período experimental. Contudo, pelos estudos realizados por Evans et al. (2006), os valores de amônia encontrados nos ensaios definitivos do presente trabalho não se mostraram elevados para a espécie, uma vez que esses autores encontraram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ de 0,98 mg L^{-1} NH_3 para *Oreochromis niloticus*. Benli, Köksal e Özkul (2008) mostraram em seus estudos que a exposição de amônia em *Oreochromis niloticus* em concentrações menores do que 2,0 mg L^{-1} por um período de seis semanas, não resulta em danos histopatológicos nas brânquias, fígado e rins.

Pode-se concluir que a partir desses estudos citados, os valores de amônia encontradas no presente trabalho reduziram a possibilidade de mortalidade causada por essa variável, pois a mesma esteve em concentrações aceitáveis pela espécie em questão.

As Figuras 34, 35 e 36 mostram respectivamente as concentrações obtidas dos metais dissolvidos nas soluções em função do tempo para os ensaios de toxicidade aguda com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio.

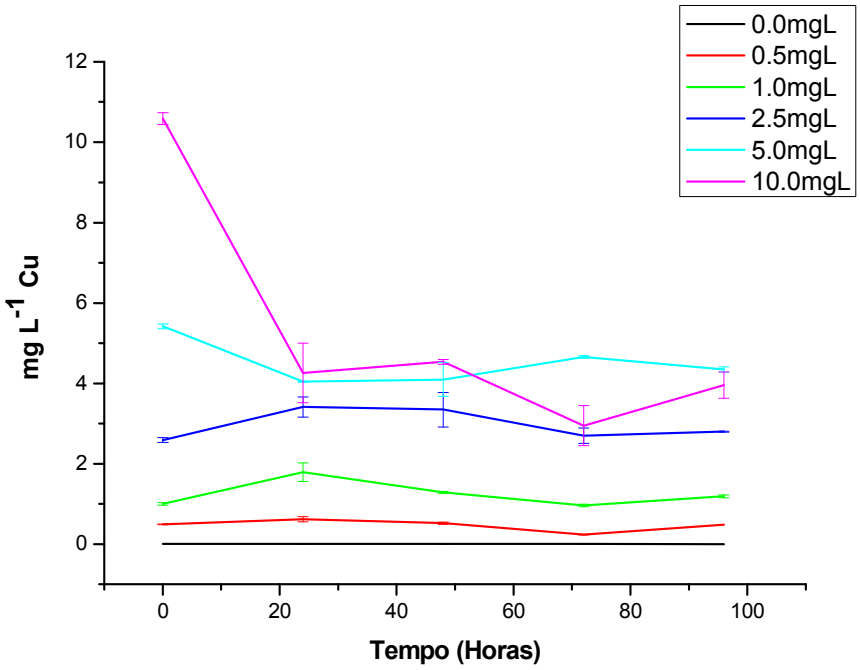

Figura 34 - Concentração (mg L^{-1}) obtida de cobre ($CuCl_2$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre

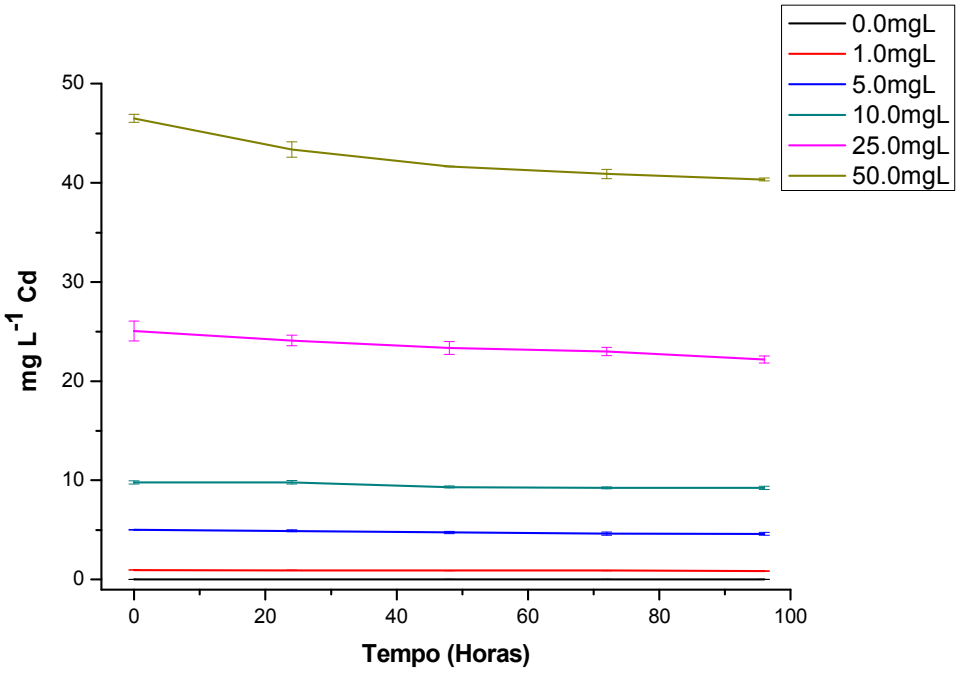

Figura 35 - Concentração (mg L^{-1}) obtida de cádmio ($CdCl_2.H_2O$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cádmio

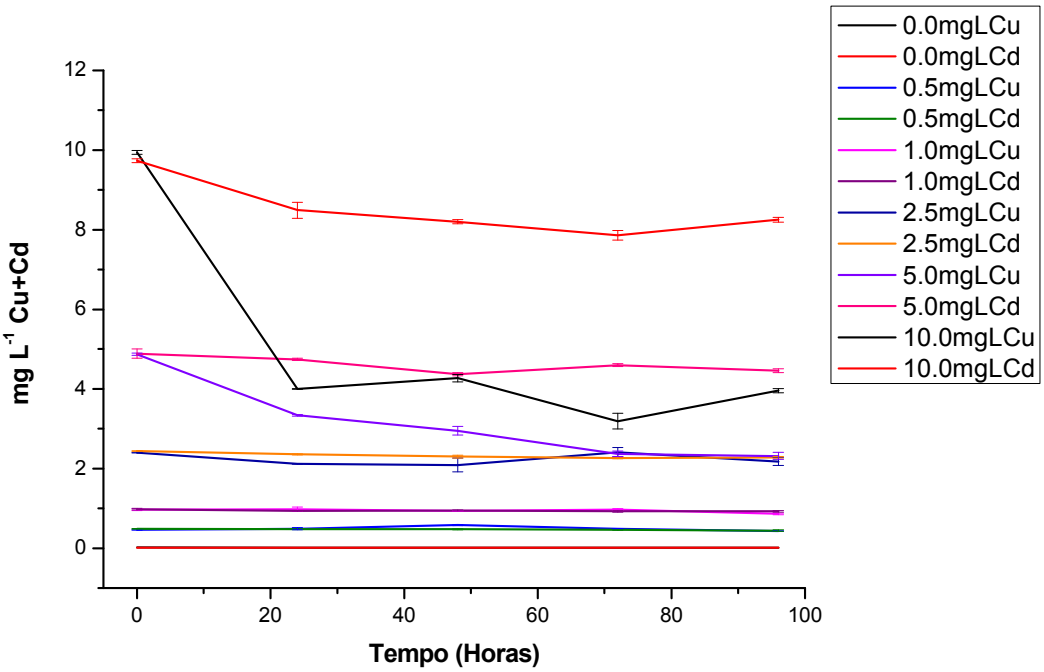

Figura 36 - Concentração (mg L^{-1}) obtida de cobre ($CuCl_2$) e cádmio ($CdCl_2.H_2O$) na solução durante o ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre + cloreto de cádmio

De forma semelhante aos ensaios preliminares, no ensaio de toxicidade aguda com cloreto de cobre na concentração de 10,0 mg L^{-1}, houve redução acentuada na concentração desse metal na solução durante o período experimental. Isto em função da constante de solubilidade do sal $Cu(OH)_2$ formado nos aquários aos valores de pH utilizados no ensaio. Essa deficiência é impossível de ser contornada, a não ser com o emprego de soluções tampão, que estabilize o pH do meio a valores abaixo daqueles que facilitem a precipitação do metal, porém dentro de uma faixa recomendada para a realização do ensaio. Este fenômeno deve ocorrer, independentemente do tipo de ensaio utilizado, seja este estático, semi-estático ou contínuo.

Para o ensaio com cloreto de cádmio, as concentrações dos metais na solução mantiveram-se estáveis durante todo o período experimental, com exceção a concentração de 50,0 mg L^{-1} que apresentou uma leve precipitação no decorrer do período experimental.

Quando os metais cobre e cádmio se encontram combinados, assim como no ensaio preliminar, a precipitação de ambos os metais se torna mais acentuada. Isso ocorre devido à co-precipitação do cádmio com o cobre, sendo que este último apresenta mais facilidade de precipitação quando o cádmio está presente.

Nas demais concentrações dos ensaios de toxicidade aguda ocorreram apenas um leve decréscimo das concentrações dos metais nas soluções em função do tempo. Isso pode ser atribuído a uma perda por bioconcentração dos mesmos pelos organismos e por outras supostas perdas, como adsorção às paredes e erros no preparo de soluções teste. As diferenças entre as concentrações esperadas e obtidas mostram a importância de se aferir as espécies químicas de interesse na condução de um experimento. Saliente-se que o fator de bioconcentração deva ser estimado com base nas concentrações efetivas.

5.4. Ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Para o ensaio crônico, o intervalo das variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) nas concentrações testadas monitoradas durante as amostragens de 0, 24 e 96 horas, 07, 14 e 21 dias durante o período experimental de 21 dias, com as soluções $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ são ilustradas na tabela 13.

Tabela 13 – Intervalo de valores registrados para as variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH e O.D), nas concentrações testadas, monitoradas durante as amostragens de 0, 24 e 96 horas, 07, 14 e 21 dias do ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

Concentrações	Temperatura (°C)	pH	O.D (mg L^{-1})
0,0 mg L^{-1}	24,49±0,08 - 25,71±0,13	7,03±0,01 - 7,56±0,00	5,92±0,12 - 8,24±0,30
0,120 mg L^{-1} Cu	24,77±0,06 - 25,92±0,12	6,75±0,10 - 7,66±0,10	5,78±0,04 - 8,40±0,23
0,35 mg L^{-1} Cu	25,05±0,05 - 26,04±0,04	7,25±0,04 - 7,68±0,05	5,73±0,01 - 8,14±0,98
0,65 mg L^{-1} Cd	25,15±0,04 - 26,15±0,00	6,63±0,06 - 7,60±0,11	6,17±0,03 - 7,63±0,12
2,0 mg L^{-1} Cd	25,08±0,09 - 26,18±0,07	7,26±0,08 - 7,57±0,08	6,49±0,03 - 8,08±0,03
0,05 mg L^{-1} Cu+Cd	25,16±0,01 - 26,23±0,04	6,42±0,15 - 7,68±0,03	6,49±0,25 - 7,89±0,81
0,140 mg L^{-1} Cu+Cd	25,06±0,04 - 26,15±0,06	6,48±0,02 - 7,65±0,03	6,44±0,08 - 7,59±0,12

A temperatura nos ensaios crônicos com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ ficou compreendida entre 25±1, o pH entre 6,42 e 7,68, e o oxigênio dissolvido permaneceu no intervalo de 5,73 mg L^{-1} a 8,40 mg L^{-1}.

Observa-se que durante o período experimental de 21 dias, as variáveis temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido mantiveram-se sem variações significativas nas concentrações testadas, reduzindo dessa maneira a possibilidade de mortalidade devido a variações bruscas nas qualidades físico-químicas da água utilizada nos testes.

A amplitude dos intervalos de variação obtidos para as variáveis físico-químicas da água nos ensaios de toxicidade crônicos indicam que a conduta de substituições das soluções adotada foi satisfatória, tendo-se os mesmos variabilidade menor do que aquelas dos ensaios realizados de duração inferiores de tempo, como os preliminares e agudos.

A dureza total monitorada apenas nos tratamentos controle, no primeiro e último dia dos ensaios crônicos com cobre, cádmio e cobre+cádmio foi 65,21±1,03 mg L^{-1} $CaCO_3$. Embora a dureza total esteja fora do intervalo de concentração recomendado pela ABNT (Norma 15088), entre 40,0 e 48,0 mg L^{-1} $CaCO_3$, nada poderia ser modificado, por se tratar da fonte de água disponível proveniente das ETA (Estação de Tratamento de Água), a não ser através do preparo de água sintética, conforme indicado na literatura (ABNT 15088, 2004), o que se torna inviável do ponto de vista operacional e de praticidade.

Na Figura 37 apresenta-se as concentrações obtidas para a amônia, durante o ensaio crônico com cobre, cádmio e cobre+cádmio. Essa espécie química foi aferida durante os períodos de amostragens de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias.

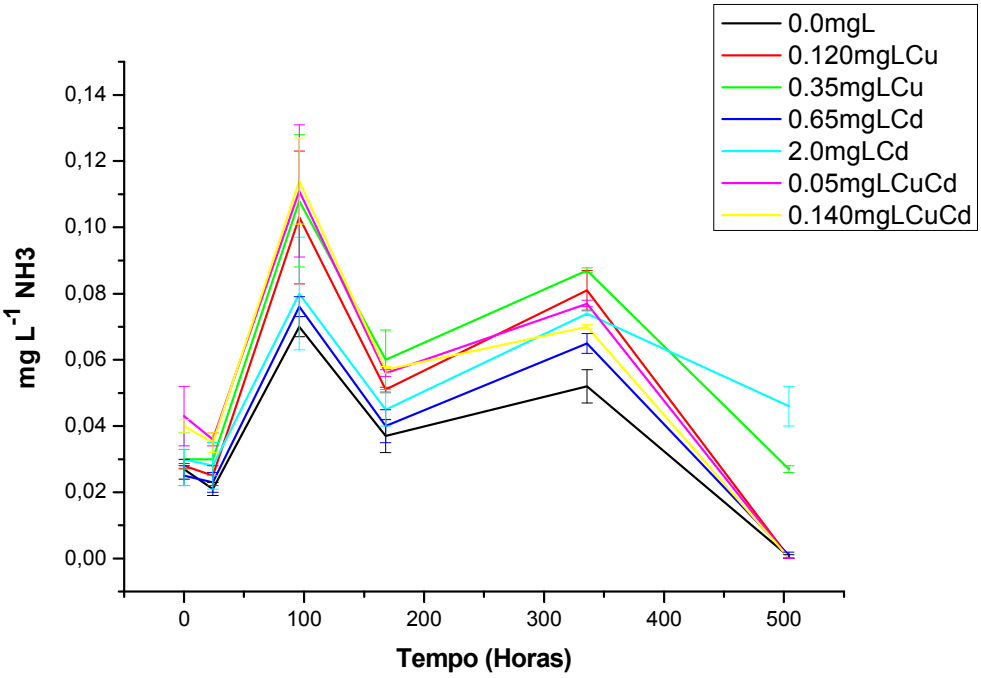

Figura 37 – Níveis de amônia (mg L^{-1} NH_3) aferida durante os períodos de amostragens de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias para o ensaio crônico com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$

A partir da observação da Figura 37 pode-se verificar que a amônia durante o período experimental de 21 dias, apesar de sua variação, ficou compreendida entre 0,001 e 0,11 mg L^{-1} NH_3. Apesar de apresentar no período experimental de 21 dias uma grande variação nos valores, nota-se uma relativa padronização nas linhas gráficas, representando as respostas da biota a diferentes tratamentos. Este padrão

ilustra que a variação ocorrida não tem relação com os valores das concentrações dos metais testadas, mas sim com a biologia dos espécimes presentes nas cubas experimentais. Outro fato que explica essa padronização é o tipo de sistema empregado no ensaio crônico, o semi-estático, com trocas de ¼ de água a cada 96 horas de experimentação.

A tendência de diminuição nos valores da variável amônia observada com o decorrer do período experimental deve-se à retirada dos organismos-teste das cubas experimentais durante os períodos de amostragens, que são os mesmos apresentados nesta figura (0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias).

Pode-se dizer que os valores de amônia obtidos neste ensaio estiveram inferiores aos limites máximos permitidos para a espécie *Oreochromis niloticus*, pois de acordo com Evans et al. (2006), a $CL_{50\text{-}96h}$ encontrado em seus estudos com a espécie em questão foi 0,98 mg L^{-1} NH_3 e para Caglan, Benli e Koksal (2005), valores de $CL_{50\text{-}48h}$ para larvas e alevinos de *Oreochromis niloticus* foram 1,009±0,02 mg L^{-1} NH_3 e 7,40±0,01 mg L^{-1} NH_3 respectivamente. Esses estudos mostram que os valores de amônia encontradas no presente trabalho reduziram a possibilidade de mortalidade causada por essa variável, pois a mesma esteve em concentrações aceitáveis pela espécie utilizada.

Apesar de os níveis de concentração de amônia estarem bem abaixo daqueles considerados tóxicos para a espécie, estes variaram sistematicamente com a concentração dos analitos e foram mais elevados para os tratamentos que revelaram menores $CL_{50\text{-}96h}$. Essa dinâmica parece ser indicativa de um aumento do metabolismo dos peixes submetidos a condições mais agressivas e estressantes.

Assim como realizado nos ensaios preliminar e agudo, no teste crônico com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio, as concentrações dos metais dissolvidos nas cubas experimentais foram aferidas durante todo o período de 21 dias. As aferições foram realizadas em 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias e estão apresentadas nas Figuras 38, 39 e 40.

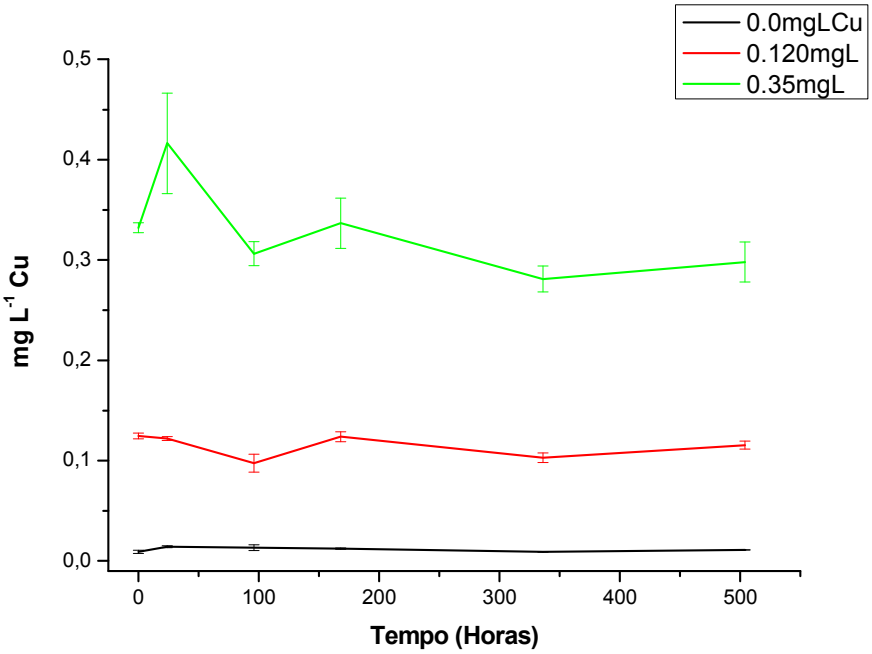

Figura 38 – Concentrações de cobre dissolvido (mg L^{-1} Cu) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CuCl_2$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio

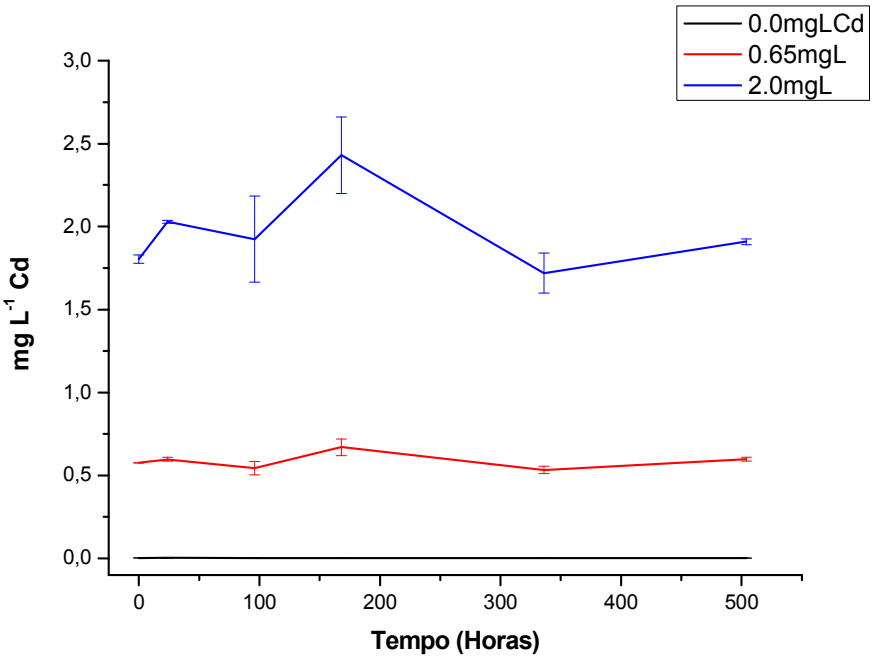

Figura 39 – Concentrações de cádmio dissolvido (mg L^{-1} Cd) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CdCl_2.H_2O$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio

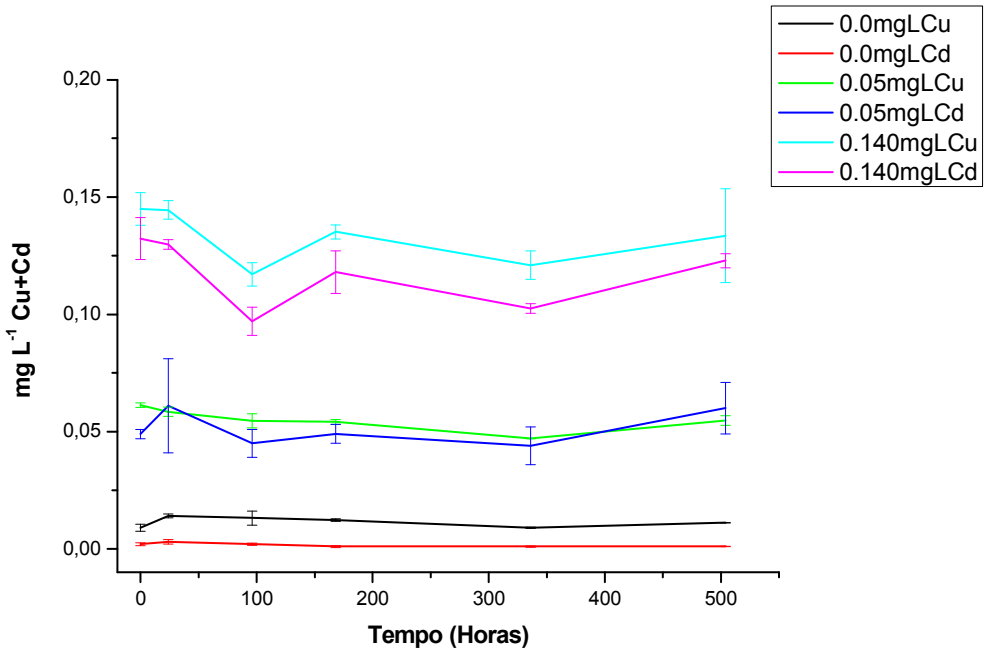

Figura 40 – Concentrações de cobre e cádmio dissolvidos (mg L^{-1} Cu+Cd) obtidas durante ensaio de toxicidade crônica com $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$. Aferições realizadas durante o período de 0, 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias de ensaio

Nas Figuras 38, 39 e 40 para as concentrações de 0,35 mg L^{-1} Cu do ensaio com $CuCl_2$, 2,0 mg L^{-1} Cd do ensaio com $CdCl_2.H_2O$ e 0,05 mg L^{-1} Cu+Cd do teste utilizando a mistura dos dois metais, observa-se uma elevação nas referidas concentrações entre o período de 0 e 24 horas. Este aumento é observado nos três ensaios durante um único ciclo de análise analítica realizada e deve-se provavelmente a alguma falha ocorrida durante esta análise.

Nas Figuras 38 e 39 observa-se que as curvas, apresentam pequena variação de valores em relação ao período experimental de 21 dias. Porém estas são mais acentuadas para as maiores concentrações (0,35 mg L^{-1} Cu e 2,0 mg L^{-1} Cd). O mesmo comportamento pode ser verificado para a concentração de 0,140 mg L^{-1} Cu+Cd na Figura 40.

Essa variação nos valores das concentrações dos metais pode ser explicada por eventuais precipitações ocorridas durante o ensaio experimental, pelas trocas de ¼ de água a cada aproximadamente 96 horas de ensaio reestabelecendo as

concentrações testadas, pela bioacumulação dos metais dissolvidos pelos organismos e pela diminuição dos mesmos através de suas retiradas nos períodos amostrais.

Nos ensaios com $CuCl_2$, $CdCl_2.H_2O$ e $CuCl_2$+$CdCl_2.H_2O$ observa-se que ocorreu uma padronização nas linhas gráficas com relação ao período experimental, onde as mesmas diminuíram nos intervalos de 24 a 96 horas e 168 a 336 horas, e aumentaram no intervalo de 96 a 168 horas e 336 a 504 horas.

O aumento observado nos valores dos sais dissolvidos na solução entre o intervalo de 96 a 168 horas deve-se a realização de troca de ¼ de água nas cubas experimentais, restabelecendo as concentrações esperadas.

Para o intervalo de 168 a 336 horas, observa-se uma relativa diminuição nas concentrações dos sais mesmo realizando trocas de ¼ de água nos aquários. Percebe-se que a mesma não foi suficiente para restabelecer as concentrações desejadas, sendo que isso pode ser atribuído à bioacumulação ocorrida pelos organismos durante esse período, por eventuais precipitações dos sais e por erros ocorridos durante o preparo das soluções para restabelecimento desejado das concentrações.

No intervalo de 336 a 504 horas observa-se um aumento nas concentrações estudadas, isso devido ao restabelecimento das concentrações em decorrências das trocas de água realizada nesse período e pela diminuição do número de organismos presentes nas cubas experimentais, retirados durante os períodos amostrais.

5.5. Bioacumulação de cobre e cádmio nos tecidos e órgãos de *Oreochromis niloticus*

Em geral, espécies químicas presentes no ambiente acumulam-se nos organismos, atingindo níveis superiores ao do meio abiótico, ênfase aos sistemas aquáticos, podendo, causar dessa maneira, efeitos deletérios aos mesmos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Para o caso dos metais, essa absorção é verificada na forma iônica, estando envolvidas neste processo três possíveis rotas de absorção: pele, brânquias e alimentação (HEATH, 1995).

No interior dos organismos, os metais ligados às proteínas, são transportados pelo sangue, podendo se acumular nas brânquias, gorduras, rins, músculo, intestino e especialmente no fígado (HEATH, 1995).

O acúmulo preferencial de metais no fígado, rins e intestinos deve-se sobretudo, ao papel fundamental dos mesmos no processo de detoxificação de substâncias tóxicas nos organismos (LINDE; INÁCIO; VIANA, 2004).

Neste trabalho, como preconizado, uma pequena parte do cobre e do cádmio presentes na solução-teste foi absorvida pelos peixes, ou bioconcentrado. Este processo pode ser comprovado pela concentração dos metais nos tecidos dos organismos, a serem apresentadas a seguir.

As Figuras 41, 42 e 43 ilustram os processos de concentração de cobre e cádmio (µg g^{-1}) no fígado, brânquias e tecido muscular dos organismos-teste durante o período de 48 horas dos ensaios preliminares com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio respectivamente.

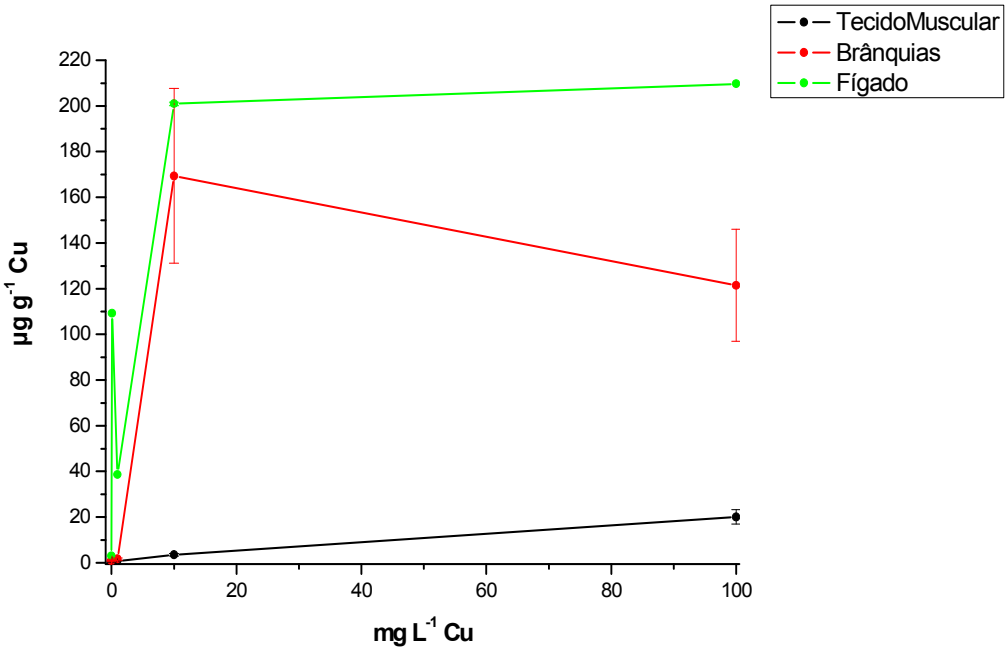

Figura 41 – Teores de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0 mg L^{-1} Cu durante 48 horas (ensaio preliminar)

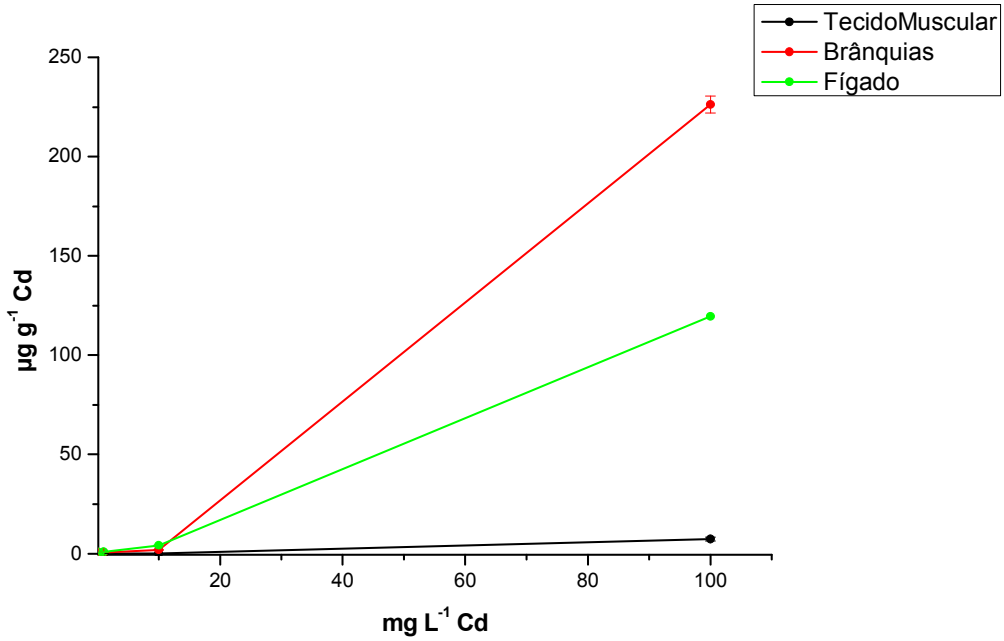

Figura 42 – Teores de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 1,0, 10 e 100,0 mg L^{-1}Cd durante 48 horas (ensaio preliminar)

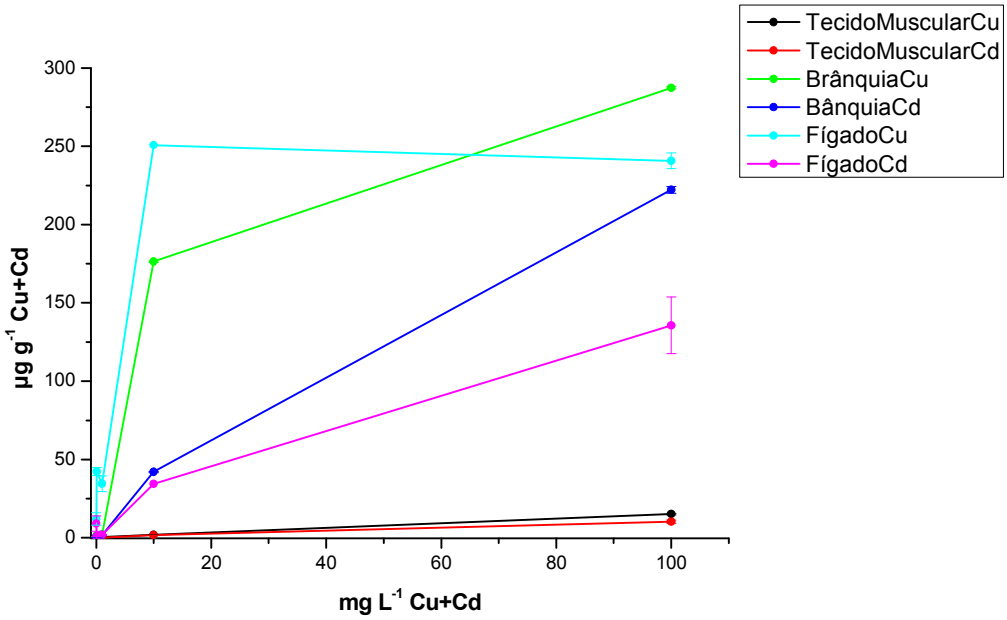

Figura 43 – Teores de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,1, 1,0, 10 e 100,0 mg L^{-1} Cu+Cd durante 48 horas (ensaio preliminar)

De uma forma geral, nos ensaios preliminares, as concentrações dos metais nos tecidos foram relativamente maior no fígado, seguido das brânquias e tecido muscular, tanto para o Cu, como para o Cd, sendo as concentrações de mesma magnitude para os dois elementos. Entretanto observa-se uma nítida tendência de absorção diferenciada dessas espécies químicas, mostrando ser a cinética do processo, mais imediata para o Cu do que para o Cd. Ou seja, a bioconcentração se manifesta de forma diferente para os dois metais. Exceção sendo feita para o tecido muscular. Conforme indicam autores mencionados acima, há uma tendência preferencial de acúmulo de cátions metálicos em órgãos como o fígado e as brânquias. No primeiro caso pelo processo de detoxificação e no caso das guelras por se constituir em uma das importantes vias de absorção das espécies dissolvidas. A observação do processo quando dos metais em combinação indica que o Cu determina a cinética envolvida, a qual se assemelha ao mecanismo de absorção do Cu em situação isolada (Figuras 41, 42 e 43).

Pode-se verificar uma exceção a isso, nas concentrações 100,0 mg L^{-1} para o ensaio com cloreto de cádmio, 10,0 e 100,0 mg L^{-1} para o Cd e 100,0 mg L^{-1} para o Cu, quando do teste com cloreto de cobre + cloreto de cádmio, onde uma maior bioacumulação ocorreu nas brânquias se comparado ao fígado.

As brânquias apresentam ampla capacidade de absorver e armazenar metais dissolvidos, devido à sua elevada superfície de exposição para as trocas gasosas, podendo dessa maneira, reduzir a quantidade de metais disponíveis para transferi-los ao sangue e então a outros órgãos (McGEER et al., 2000a e 2000b).

Nogami et al. (2000) em seu estudo sobre o efeito da concentração de cádmio (Cd^{2+}) em *Oreochromis niloticus* a partir de uma dieta alimentar, constataram uma bioacumulação maior desse metal nas vísceras quando comparado ao tecido muscular, mostrando uma correspondência com os resultados obtidos no presente estudo.

Karayakar et al. (2010) expondo *Anguilla anguilla* a cobre por um período de 96 horas, pode observar que a acumulação desse metal no fígado mostrou-se maior quando comparado ao tecido muscular.

Norey et al. (1990) em estudos sobre a comparação da acumulação, distribuição e excreção de cádmio nos tecidos em diferentes espécies de água doce (rainbow trout, roach e stone loach), ressaltaram que a brânquia foi o órgão primário

de acumulação em truta arco-íris, enquanto que o rim e fígado bioacumularam mais em *Noemacheilus barbatulus*.

Çoğun, Yüzereroğlu e Kargin (2003) expondo por um período de 30 dias *Oreochromis niloticus* a cobre ($CuSO_4.5H_2O$) e cádmio ($CdSO_4.8H_2O$), puderam observar uma acumulação maior desses metais no fígado, seguido pelas brânquias e tecido muscular. Esse estudo também mostrou uma correspondência com os resultados do presente trabalho para algumas concentrações experimentadas.

Na Figura 41, observa-se que para o fígado de indivíduos submetidos à concentração 0,1 mg L^{-1} Cu, a concentração foi maior do que aqueles indivíduos sob concentração de 1,0 mg L^{-1} Cu, o que se repetiu para as brânquias nas concentrações de 10 e 100 mg L^{-1}. Esse cenário, que se manifesta de forma semelhante para os dois órgãos pesquisados, pode estar relacionado tanto ao tempo de exposição dos organismos, no caso de bioconcentrar mais nos tecidos em que os organismos foram expostos a concentrações mais baixas, como também ao fato de que as brânquias pela elevada superfície de exposição que encerram, reterem nas entranhas dos compartimentos do tecido, soluções do meio abiótico, com elevada concentração. Ou seja, o processo de preparo de amostras, que inclui uma lavagem criteriosa da amostra, é de significativa importância. Uma lavagem não bem conduzida poderá resultar em resultados superestimados, que são relativos ao metal externo presente nas soluções, mas que não foi absorvido ou bioconcentrado pelos espécimes. Deve ainda considerar possíveis diferenças metabólicas dos organismos, relacionadas à heterogeneidade da população.

Pelo mesmo motivo, observa-se na Figura 43, para o cobre e para o fígado que a bioacumulação foi maior na concentração de 0,1 mg L^{-1} do que 1,0 mg L^{-1} e na concentração de 10,0 mg L^{-1} do que na de 100,0 mg L^{-1}.

Pode-se ressaltar na Figura 43 que os valores de bioacumulação de cobre em relação ao cádmio se sobressaem. Esse fato pode ser explicado devido a grande probabilidade de armazenagem do cobre nos órgão e tecidos através da ligação com metalotioneínas e outras metaloenzimas por meio dos grupos sulfidrilas (SH), presentes nessas proteínas (ÇOĞUN; YÜZEREROĞLU; KARGIN, 2003), uma vez que esse metal é essencial e necessário para diversas funções vitais para as espécies.

Observa-se nas figuras citadas, uma ordem crescente da concentração nos órgãos e tecidos em função do aumento da concentração dos metais na solução. Esse fato constata que ocorreu uma acumulação considerável desses metais pelos organismos-teste durante o período experimental de 48 horas. Contudo, deve-se considerar que, em termos relativos, os fatores de concentração foram mais elevados para as concentrações mais baixas de metais dissolvidos. Esta sendo em essência a função do organismo bioindicador. A comparação das figuras possibilita observar que o padrão de absorção dos metais em combinação se conserva de modo semelhante a estes em forma isolada. Cabe salientar que mesmo nessas condições o Cu potencializa a absorção de Cd, onde por exemplo na concentração de 10 mg L^{-1}, o metal apresentou-se até 5 vezes mais concentrado na brânquia do que na água.

As Figuras 44, 45 e 46 são indicativas da bioacumulação (µg g^{-1}) de cobre e cádmio no fígado, nas brânquias e tecido muscular dos organismos-teste durante o período de 96 horas dos ensaios definitivos com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio respectivamente.

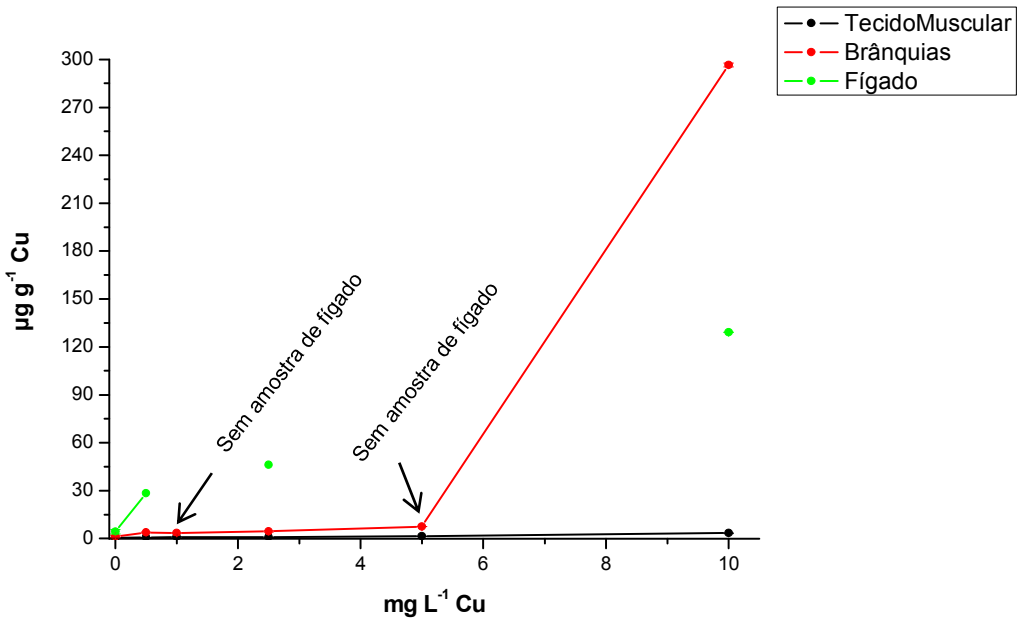

Figura 44 – Bioconcentração de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápia do Nilo expostas a soluções de 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg L^{-1} Cu, durante 96 horas (ensaio agudo)

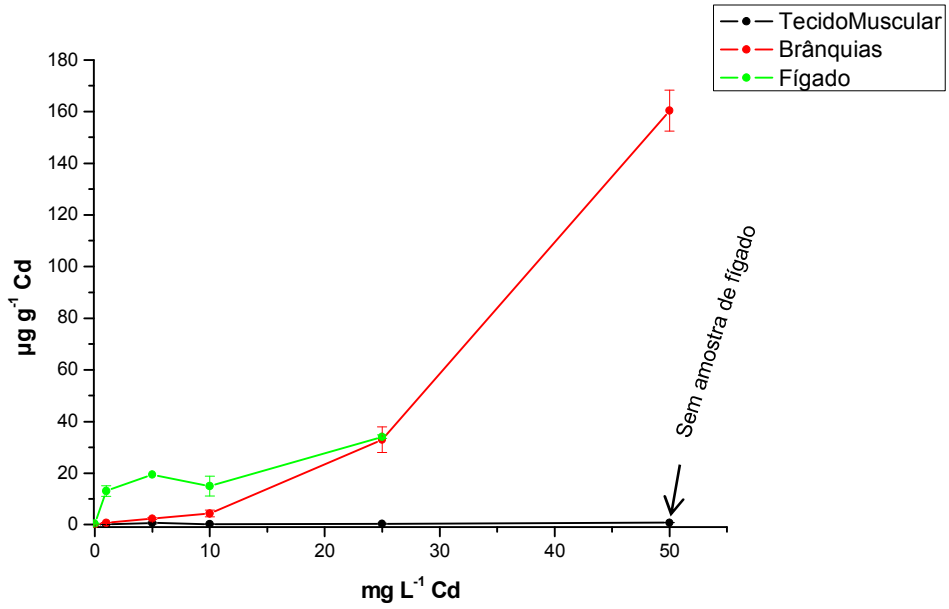

Figura 45 – Bioconcentração de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápias do Nilo expostas a soluções de 0,0, 1,0, 5,0, 10,0 25,0 e 50,0 mg L^{-1} Cd durante 96 horas (ensaio agudo)

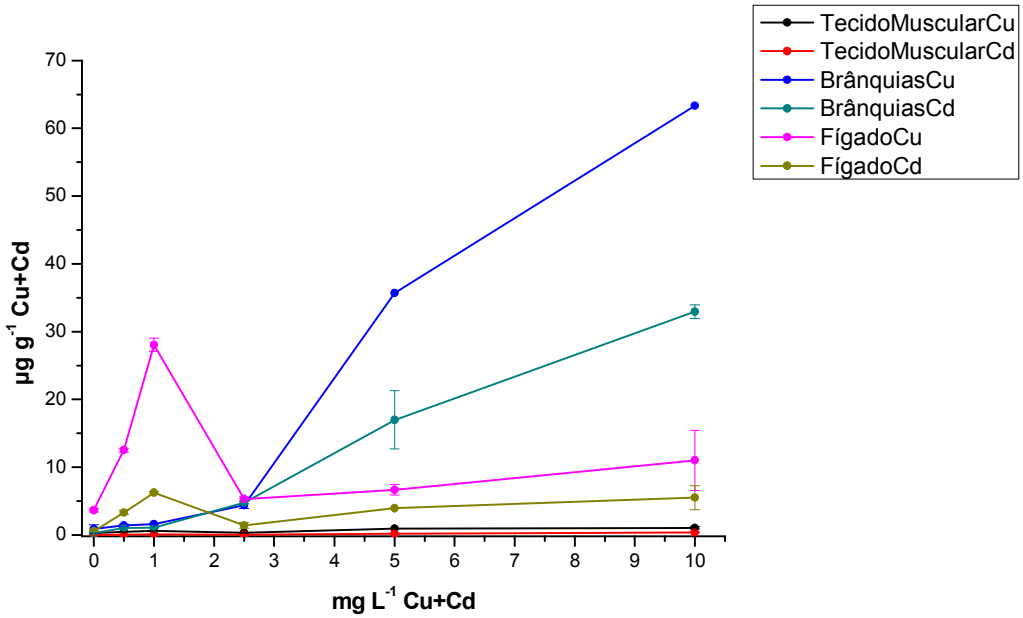

Figura 46 – Bioconcentração de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular, brânquias e fígado de Tilápia do Nilo expostas às soluções de 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg L^{-1} Cu+Cd, durante 96 horas (ensaio agudo)

Com algumas exceções, pode-se dizer que da mesma maneira como nos ensaios preliminares o fígado, de uma forma geral, apresentou maior bioacumulação dos metais em relação à brânquia e ao tecido muscular. Esses aspectos já foram comentados anteriormente neste texto e a seguir procuramos realizar outras considerações a respeito, abordando de forma mais quantitativa os valores de concentração encontrados nos tecidos, em diferentes condições do meio abiótico.

Na Figura 44, relativa ao ensaio com cobre, uma dessas exceções podem ser observadas na concentração de 10,0 mg L^{-1}. Nesta, a brânquia apresentou um elevado valor de acumulação, variando de 7,40 µg g^{-1} na concentração de 5,0 mg L^{-1} a 296,45 µg g^{-1} na concentração de 10,0 mg L^{-1}. Esse fato pode ter acontecido devido à aderência do hidróxido de cobre precipitado no muco presente nesse órgão, extrapolando dessa maneira os valores reais.

O mesmo fato pode ter acontecido nas brânquias do tratamento com Cu (Figura 46), onde há uma elevação acentuada nos valores de bioconcentração para a concentração de 10,0 mg L^{-1}. Ainda nesta figura, observa-se para o Cu que a partir da concentração de 2,5 mg L^{-1}, os valores da bioconcentração da brânquia se tornam maiores do que no fígado; o mesmo ocorrendo para o Cd em valores próximos a 2,0 mg L^{-1}. Em relação à bioconcentração de Cu no fígado, nota-se que as concentrações 0,5 e 1,0 mg L^{-1} apresentaram valores maiores do que a concentração de 2,5 mg L^{-1}.

Quando se estabelecem comparações entre os ensaios preliminares e agudos, os quais são constituídos de concentrações diferentes em tempos de exposição também diferentes, são confirmadas tendências de maior acumulação do cobre em relação ao cádmio para todos os substratos analisados. Outro aspecto interessante diz respeito às magnitudes de concentrações dos metais encontradas nestes tecidos, para as condições de ensaios preliminares e de toxicidades agudas. No primeiro caso a mesma ordem de grandeza de absorção é mantida para os metais na forma isolada e em combinação. Este tipo de comportamento já não sendo verificado para os ensaios agudos, onde os metais na forma combinada são concentrados em níveis até quatro vezes inferiores aos metais isolados. Nos dois casos não se distingue padrões diferentes de absorção para um metal essencial, como o Cu, e um metal não essencial como o Cd.

Os resultados obtidos são semelhantes aqueles verificados por outros autores, conforme comentamos a seguir.

Cicik e Karayakar (2004) constataram em seu estudo sobre a acumulação de cádmio e chumbo em tecidos e órgão de *Oreochromis niloticus* que a bioconcentração de cádmio comparado ao controle seguiu a seguinte ordem: rim>fígado>baço>brânquias>músculo.

Kalay e Erdem (2003), a partir de seus estudos sobre os efeitos da acumulação de cádmio sobre os níveis de proteínas totais em *Oreochromis niloticus*, mostraram que o cádmio primeiramente concentrou no fígado, local onde as metalotioneínas são sintetizadas, enquanto que a acumulação do tecido renal excedeu os níveis de acumulação no fígado com o aumento do período de exposição.

Visnjic-Jeftic et al. (2010) observaram em seu estudo sobre a acumulação de metais em músculo, fígado e brânquias de *Alosa immaculata* que os metais Al, Sr, Ba, Mg e Li apresentaram alta concentração nas brânquias do organismo em estudo, enquanto que Cd, Cu, Zn, Fe e B apresentaram uma maior concentração no fígado. Os autores constataram, assim como no presente estudo, que o tecido muscular apresentou a menor concentração dos elementos analisados.

Mazon e Fernandes (1999) realizaram um estudo sobre a toxicidade e acumulação de cobre em diferentes tecidos de *Prochilodus scrofa* e constataram que o cobre apresentou maior acumulação no fígado quando comparado a outros tecidos, seguido pelos intestinos e rins. Os autores sugerem que a brânquia seja o principal local de absorção de cobre, particularmente em peixes de água doce, devido a grande superfície de contato com o ambiente externo, entretanto a acumulação de cobre nas brânquias da espécie estudada foi menor que no fígado, intestino e rins, o que estaria em desacordo ao verificado por McGeer et al. (2000a e 2000b), citados acima.

Cinier et al. (1997), concluiram em seus estudos sobre acumulação de cádmio em *Cyprinus carpio* que para rins e fígado, os níveis de acumulação desse metal atingiram um valor máximo de concentração, enquanto para o tecido muscular, a absorção de cádmio aumentou em função do período de exposição, o que pode ser também observado no presente trabalho. Os autores sugeriram que para a carpa, rim e fígado apresentam uma capacidade de armazenagem limitada, enquanto que o tecido muscular pode ser considerado um local de estocagem a longo prazo.

Ainda que sejam verificadas na literatura variações nos resultados encontrados para as concentrações de cobre e cádmio nos tecidos e órgãos de peixes, deve-se considerar que os valores de concentrações encontrados para os metais analisados nas brânquias podem ser oriundos de falhas na prática do preparo deste substrato em particular, por suas características peculiares, como explicado em detalhes anteriormente. No caso do cobre, essa ocorrência sendo mais perceptível aos olhos, pela coloração exibida superficialmente, de cor azulada (BOOK; NETO, 2000). Há situações, contudo, em que o muco certamente formado não apresenta coloração perceptível, como no caso do cádmio (LICHTENFELS et al., 1996; TAO et al., 2000a e 2000b). Trata-se então de eliminar-se a fração do metal adsorvido e não absorvido. Com esses objetivos é que se utiliza lavagem ácida em pelos de animais aquáticos (JOSEF et al., 2008), o que é relativamente mais simples de ser executado. Assim, a etapa de lavagem no preparo das amostras de brânquia para análise, reveste-se de fundamental importância, tendo que ser conduzida de formas a eliminar por completo esta “solução intersticial”. Faz-se importante salientar que esta particularidade essencial no preparo de amostras de brânquias não fora mencionada em nenhuma das referências consultadas para esta pesquisa.

A seguir, através das Figuras 47, 48 e 49, passa-se a comentar os resultados relativos aos ensaios de toxicidade crônica, cuja abordagem atem-se também aos mesmos aspectos discutidos para os ensaios preliminares e de toxicidades agudas. Ou seja, os resultados observados são, em essência, função das concentrações das espécies químicas e do tempo de exposição dos espécimes nessas concentrações, em acordo aos conceitos básicos em toxicologia (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Constata-se que as concentrações selecionadas para os ensaios estiveram a contento, possibilitando realizar o experimento até ao seu final programado, sem a ocorrência de óbitos. Isso sendo uma demonstração de que a resposta aos agentes químicos externos pelos organismos ocorre de forma logarítimica, sendo que as respectivas concentrações foram eleitas levando-se em conta as $CL_{50\text{-}96h}$ dos elementos químicos isolados e em combinação (MATTHIESSEN, 2012)[3]. Em sendo assim, os resultados são verdadeiros atestados de que as condições experimentais estabelecidas no laboratório foram satisfatórias, mesmo em condições estáticas e

[3] [3] MATTIESSEN, P. Comunicação Pessoal, abril, 2012.

semi-estáticas, estando as variáveis físico-químicas e a relação biomassa/volume dos aquários, dentro de intervalos de variação que não causou efeitos nos indivíduos. Os níveis de amônia encontrados corroboram com as ótimas condições do meio biótico estabelecidas e os valores de dureza, embora fixados acima do ótimo ideal pela ABNT, estiveram também aceitáveis. Por outro lado, para saber se as concentrações das espécies metálicas utilizadas não foram também subestimadas, haveria necessidade de se quantificar os níveis de metalotioneínas-MTs nos tecidos, principalmente no fígado, os quais são induzidas pela presença das espécies químicas estudadas (KALAY; ERDEM, 2003).

Essas figuras são indicativas da bioconcentração de cobre e cádmio em µg g^{-1} nas brânquias e no tecido muscular dos organismos-teste, durante os períodos de amostragem de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias nos ensaios crônicos com cloreto de cobre, cloreto de cádmio e cloreto de cobre + cloreto de cádmio respectivamente.

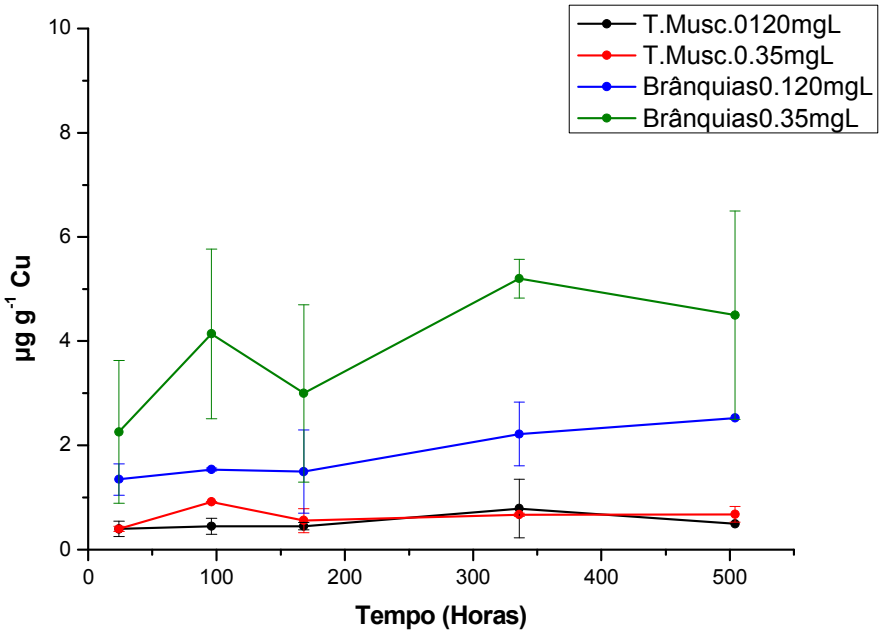

Figura 47 – Níveis de cobre (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cobre em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias

Infelizmente, para todas as situações, não foi possível obter-se dados relativos à bioconcentração no fígado. Este aspecto faz merecer que se comente as dificuldades envolvidas em trabalhos dessa natureza com organismos pequenos, pela limitação analítica existente em relação à pouca biomassa disponível. Desta forma a dinâmica de absorção de Cu e Cd nos ensaios crônicos serão somente conhecidas para as brânquias e tecido muscular.

Verifica-se que a bioconcentração processa-se em maior escala nas brânquias para ambos os metais, sendo mais acentuada à medida que a concentração aumenta. No tecido muscular essa diferenciação é pouco significativa. Esse quadro pode ser explicado pelas funções distintas na fisiologia da espécie dos dois substratos considerados. Observa-se uma correspondência com os resultados do presente estudo, o trabalho realizado por Çoğun, Yüzereroğlu e Kargin (2003), onde os autores verificaram uma bioconcentração do cobre ($CuSO_4.5H_2O$) e cádmio ($CdSO_4.8H_2O$) em *Oreochromis niloticus*, maior nas brânquias em comparação com o tecido muscular.

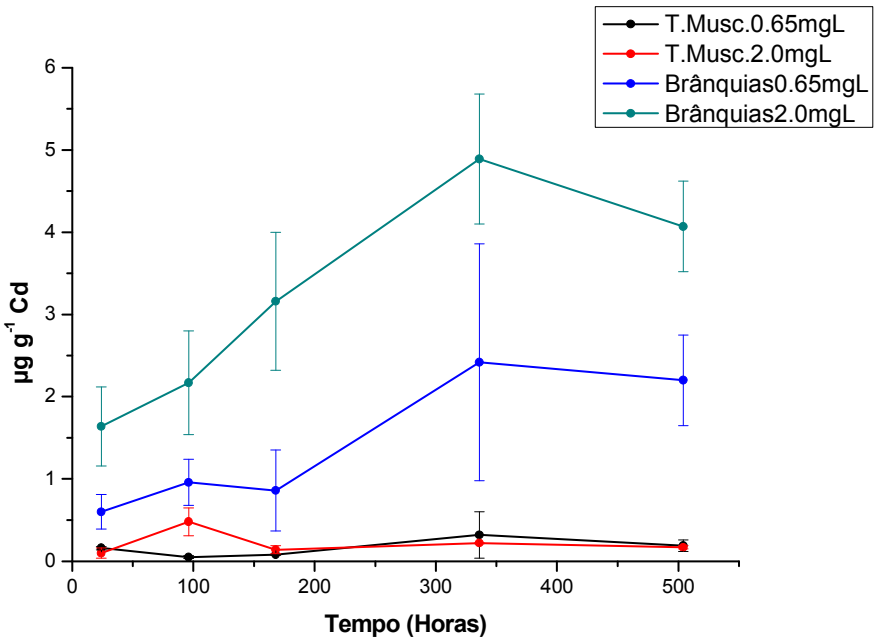

Figura 48 – Níveis de cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cádmio em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias

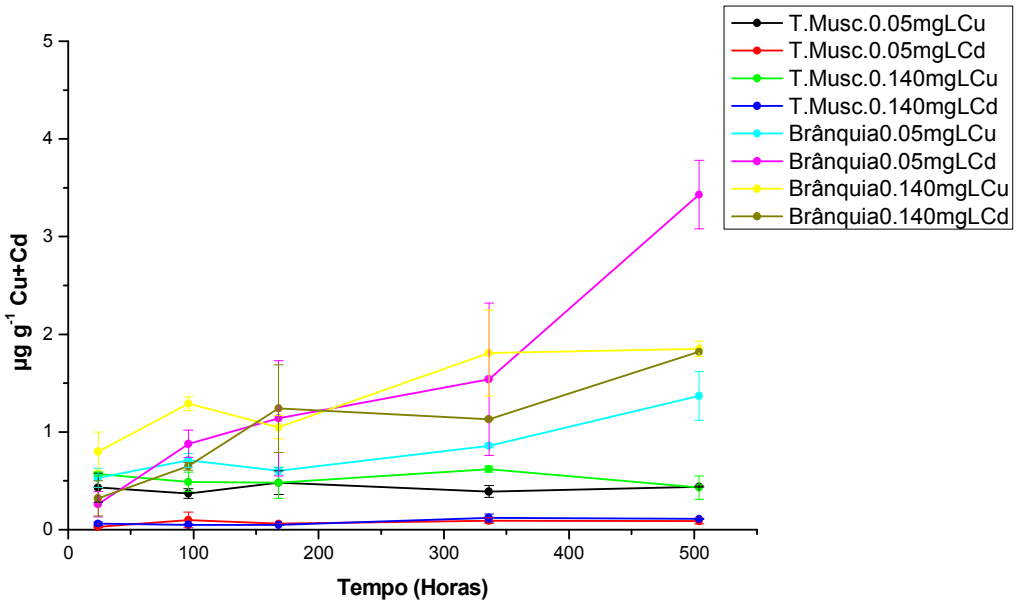

Figura 49 – Níveis de cobre+cádmio (µg g^{-1}) em amostras de tecido muscular e brânquias de Tilápias do Nilo, durante o ensaio crônico de 21 dias com cloreto de cobre + cloreto de cádmio em períodos amostrais de 24, 96 horas, 07, 14 e 21 dias

Em todas as situações observadas nas Figuras 47, 48 e 49, há uma tendência de aumento da concentração nos tecidos com o tempo. É interessante observar-se para o período de 96h a formação de um pico, cujo período é coincidente com aquele estipulado para a realização dos ensaios de toxicidade aguda (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

O mecanismo de absorção das espécies químicas dissolvidas parece diferir da situação em combinação, possivelmente pela competição entre os sítios ativos das proteínas que os complexam (KALAY; ERDEM, 2003). A tendência da ocorrência de diminuição dos níveis de metais nos tecidos após o período de 14 dias pode revelar uma tendência natural de defesa da espécie através de excreção.

As concentrações resultantes dos metais nos tecidos, tanto na situação isolada, quanto em combinação, indica não haver comprometimento do uso dos organismos ao consumo, uma vez que a legislação brasileira apresenta limites de 30,0 µg g^{-1} Cu (ANVISA - Portaria 658/98) e 1,0 µg g^{-1} Cd (BRASIL, 1965 - Decreto n° 55871/65). Essas informações são de extrema importância do ponto de vista de saúde, contribuindo para o incentivo do consumo da tilápia, peixe de importância

econômica na pesca interior do Estado de São Paulo, uma vez que as concentrações dessas espécies dissolvidas são significativamente inferiores em águas naturais, onde Cu e Cd apresentam teores máximos, de acordo com a Resolução CONAMA n° 20, de 20,0 $\mu g\ L^{-1}$ e 1,0 $\mu g\ L^{-1}$ respectivamente.

6. CONCLUSÕES

Os ensaios de toxicidade aguda com cobre e cádmio isoladamente e misturados apresentaram valores de $CL_{50\text{-}96h}$ que proporcionaram verificar a grande resistência da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao cádmio em comparação ao cobre e à combinação dos metais.

A espécie apresentou resistência de aproximadamente seis vezes mais intensa ao cádmio em relação ao cobre, e a combinação dos elementos químicos apresentou-se da ordem de 2,5 vezes mais tóxica à espécie, do que quando em situação em que o cobre ocorre isoladamente, podendo observar que a combinação dos metais potencializou a toxicidade de forma sinérgica.

As diferenças apresentadas na sensibilidade da espécie ao cobre e cádmio, possibilita afirmar que a Tilápia do Nilo é um excelente bioindicador para a avaliação da contaminação ambiental causada pelo cobre e pela mistura dos dois metais, porém para o cádmio isoladamente, a mesma não se mostra adequada para testes ecotoxicológicos, devido a sua alta resistência. Neste caso, pode-se utilizar das análises químicas de seus tecidos como uma ferramenta útil para verificar os mecanismos de toxicidade desse metal em organismos aquáticos.

O estudo em questão pode revelar a importância das aferições das concentrações efetivas dos elementos de interesse durante ensaios de toxicidade, principalmente para o cálculo do fator de bioconcentração, uma vez que, as concentrações obtidas podem diferir das esperadas, dependendo do elemento analisado, como aconteceu com o $CuCl_2$ no presente estudo, precipitando-o na forma de hidróxido de cobre devido ao seu produto de solubilidade ser menor do que ao $CdCl_2.H_2O$ e devido ao pH utilizado durante os ensaios, o qual facilitou a precipitação.

Nas condições experimentais utilizadas não ocorreram reduções significativas de Cd em todos os níveis de concentrações empregadas, quando isoladamente. Na presença de Cu, observou-se co-precipitação do metal para níveis de 10 mg L^{-1} Cd.

A bioconcentração do cobre e cádmio nos tecidos e órgãos das Tilápias do Nilo revelou que de uma forma geral, o fígado acumulou uma maior quantidade desses metais se comparado à brânquia e tecido muscular, apresentando esse último a menor acumulação em todos os ensaios. Notou-se um efeito mais agressivo

ao organismo do cobre em relação ao cádmio, afetando principalmente o fígado através de necroses, induzindo a uma sistemática redução da massa deste órgão com o aumento da concentração do metal dissolvido.

O ensaio de toxicidade aguda na forma estática mostrou-se estável e confiável para o estabelecimento das respectivas $CL_{50\text{-}96h}$ de Cu e Cd para tilápias.

Através dos resultados de bioconcentração obtidos para Cu e Cd no tecido muscular nas condições experimentais utilizadas, pode-se prever que as tilápias não venham a concentrar esses metais no ambiente, de forma a representar restrições ao consumo humano.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. A.; BARRETO, R. E.; NOVELLI, E. L. B.; CASTRO, F. J.; MORON, S. E. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 103-108, 2009.

ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, New York, v. 27, p. 673–679, 2002.

ALMEIDA, J. A.; NOVELLI, E. L. B.; SILVA, M. D. P.; JUNIOR, R. A. Environmental cádmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, London, v. 114, p. 169-175, 2001.

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II**): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. 2001. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685 de 27/8/1998. **Diário Oficial da União,** Poder Executivo, Brasília, DF, 28 ago. 1998.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaio de toxicidade com organismos aquático. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**. Métodos e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. p. 117-152.

ARAÚJO, C. V. M.; COHIN-DE-PINHO, S. J.; CHASTINET, C. B. A.; SANTOS, J. S.; SILVA, E. M. Discriminating the pH toxicity to *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the Dunas Lake (Camaçari, BA, Brazil). **Chemosphere**, Oxford, v. 73, p. 365–370, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio em peixes. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 5761**: Determinação da dureza em água (Método Complexométrico). Rio de Janeiro, 1984.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** Amsterdam, v. 25, p. 33–38, 2008.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, New York, v. 145, p. 282-287, 2007.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2004.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 66, p. 83-92, 2004.

BENADUCE, A. P. S.; KOCHHANN, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, p. 274-282, 2008.

BENLI, A. Ç. K.; KÖKSAL, G.; ÖZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.): Effects on gill, liver and kidney histology. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, p. 1355-1358, 2008.

BHAKTA, J. N.; MUNEKAGE, Y. Role of ecosystem components in Cd removal process of aquatic ecosystem. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 32, p. 274-280, 2008.

BINEY, C.; AMUZU, A. T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I. L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P. B. O.; OSIBANJO, O.; RADEGONDE, V.; SAAD, M. A. H. Review of heavy metals in the African aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 28, p. 134-159, 1994.

BIUKI, N. A.; SAVARI, A.; MORTAZAVI, M.; ZOLGHARNEIN, H.; SALAMAT, N. Accumulation and elimination of cadmium and lead in juvenile milkfish during sublethal exposure. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v. 93, p. 2022-2033, 2011.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A. W.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 383-392, 2001.

BOOCK, M. V.; MACHADO NETO, J. G. Estudos sobre a toxicidade aguda do oxicloreto de cobre para o peixe *Poecilia reticulata*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 31, p. 29-35, 2005.

BOOCK, M. V.; NETO, J. G. M. Estudos toxicológicos do oxicloreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, p. 215-221, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, 09 abr. 1965, p. 3610.

BRAYNER, F. M. M. **Determinação de taxas de retenção de metais-traço por sedimentos orgânicos em um viveiro de piscicultura em área estuarina e urbana**. 1998. 103 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

BURGER, J. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. **Science of the Total Environmental**, Amsterdam, v. 389, p. 37-45, 2008.

BURTON JUNIOR, G. A.; MACPHERSON. C. Sediment toxicity testing issue and methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, G. A.; BURTON JUNIOR, G. A.; CAIRNS, J. R. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995.

CAGLAN, A.; BENLI, K.; KOKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, Ankara, Turkey, v. 29, p. 339-344, 2005.

CARRIQUIRIBORDE, P.; RONCO, A. E. Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu(II), and Cr(VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 86, p. 313–322, 2008.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 445 p.

CHEN, Q. L., LUO, Z.; ZHENG, J. L.; LI, X. D.; LIU, C. X.; ZHAO, Y. H.; GONG, Y. Protective effects of calcium on copper toxicity in Pelteobagrus fulvidraco: Copper accumulation, enzymatic activities,histology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 76, p. 126–134, 2012.

CICIK, B.; AY, Ö.; KARAYAKAR, F. Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in tissue and organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 72, p. 141-148, 2004.

CINIER, C. C.; PETIT-RAMEL, M.; FAURE, R.; GARIN, D. Cadmium bioaccumulation in Carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 38, p. 137-143, 1997.

ÇOĞUN, H. Y.; KARGIN, F. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 55, p. 277-282, 2004.

ÇOĞUN, H. Y.; YÜZEREROĞLU, T. A.; KARGIN, F. Accumulation of copper and cadmium in small and large Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 71, p. 1265-1271, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, 13 maio 2011. p. 89.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, 13 maio 2011. p. 89.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA. C. M. R.; ESPÍNDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DE LA TORRE, F. R.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cádmium. **Environmental Pollution**, London, v. 109, p. 277-282, 2000.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 48, p. 255-262, 2001.

DIAS, D. C.; MAIORINO, F. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, N. M.; LOMBARDI, J. V.; FERREIRA, J. R.; FRANÇCA, F. M.; FERREIRA, C. M. Avaliação Histopatológica do Baço, Coração e Encéfalo De Tilápia *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) Exposta ao Cloreto de Mercúrio. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, p. 213-220, 2007.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática** – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. cap. 7, p. 153–184.

DUPREEZ, H. H.; STEYN, G. J. A preliminary investigation of the concentration of selected metals in the tissues and organs of the tigerfish (*Hydrocynus-vittatus*) from the Olifants River, Kruger-National-Park, South-Africa. **Water SA**, Gezina, South Africa, v. 18, p. 131-136, 1992.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, E. A. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington, DC: APHA, 1995. 1368p.

EBRAHIMPOUR, M.; ALIPOUR, H.; RAKHSHAH, S. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish. **Toxicology and Industrial Health**, London, v. 26, p. 361-365, 2010.

EL DEEN A. E. N.; ZAKI, M. S.; OSMAN, H. A. Role of fulvic acid on the reduction of cadmium toxicity on tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY (Environmental Toxicology III), 3., 2010, Nicosia, Cyprus. Southampton, UK: Wessex Institute of Technology, 2010. p. 155-162.

ERK, M.; RUUSB, A.; INGEBRIGTSENC, K.; HYLLANDB, K.; BOŠKOVIC, R. Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in marine invertebrates - A radiotracer study. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, p. 1651-1664, 2005.

EVANS, J. J.; PASNIK, D. J.; BRILL, G. C.; KLESIUS, P. H. Un-ionized ammonia exposure in Nile tilapia: Toxicity, stress response, and susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 68, p. 23-33, 2006.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GRACIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 27, p. 103-109, 2007.

FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas observadas no fígado de Lambarí *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, Porto Alegre, v.15, p.166-172, 2007.

FONSECA, J. C. L. **Manual para gerenciamentos de resíduos perigosos**. Ilha Solteira: Faculdade de Engenharia, UNESP, 2009. 107 p.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; WILSON, J. M. Cadmium tolerance in the nile tilapia (Oreochromis niloticus) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, p. 36-46, 2006. DOI 10.1002/tox 20152.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 376-381, 2007.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZJAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDÉZCORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)* exposed to diazinon. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 23, p. 760-769, 2007.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A. R.; OSS, R. N.; FERNANDES, L. F. L.; MAGRIS, R. A. Acute toxicity of copper and cadmium for piauçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 31, p. 313-315, 2009.

GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.6, p.24-30, 2011.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, Pará de Minas, v. 2, n. 1, p. 156-164, 2003.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 11, p. 714-719, 1977. Correction, v. 12, p. 417, 1978.

HANDY, R .D.; EDDY, F. B.; BAINES, H. Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1566, p. 104–115, 2002.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 30, p. 77-82, 2008.

HILSDORF, A. W. S. **Avaliação genética e zootécnica de duas variedades de tilápia nilótica (*O. niloticus* var. red-stirling e *O. niloticus* var. chilatrada) para o estabelecimento de um programa de produção massal de um híbrido de tilápia vermelha**. São Paulo: CDi/FAPESP, 2007. (Projeto PIPE-FAPESP nº 01/08416-4: Inovação Tecnológica em Pequenas Empresas. Disponível em: http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/217/avaliacao-genetica-zootecnica-duas-variedades/. Acesso em: 27 dez. 2011.

HOLLIS, L.; MUENCH, L.; PLAYLE, R. C. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, p. 703–720, 1997.

ISANI, G.; ANDREANI, G.; CARPENÈ, E.; Di MOLFETTA, S.; ELETTO, D.; SPISNI, E. Effects of waterborne Cu exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A proteomic approach. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 31, p. 1051-1058, 2011.

JOSEF, C.F.; ADRIANO, L.R.; DE FRANÇA, E.J.; CARVALHO, G.G.A.; FERREIRA, J.R. Determination of Hg and diet identification in otter (*Lontra longicaudis*) feces. **Environmental Pollution**, Piracicaba, v.152, p. 592-596, 2008.

KALAY, M.; ERDEM, C. Effect of cadmium accumulation on total protein levels in *Tilapia nilotica*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, Turkey, v. 27, p. 1367-1374, 2003.

KARAYAKAR, F.; CICIK, B.; CIFTCI, N.; KARAYTUG, S.; ERDEM, C.; OZCAN, A. Y. Accumulation of copper in liver, gill and muscle tissues of *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, Pakistan, v. 9, p. 2271-2274, 2010.

KAROKOÇ, M.; DINÇER, S. Effect of temperatures on zinc accumulation in the gill, liver, and kidney of *Oreochromis niloticus* (L. 1758). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 71, p. 1077-1083, 2003.

KLEMM, D. J.; MORRISON, G. E.; NORBER-KING, T. J.; PELTIER, W. H.; HEBER, M. A. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuary organisms**. 2. ed. Washington, DC: USEPA, Environmental Monitoring and Support Lab, 1994. (EPA-600/4-91-003).

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos**: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004. 289 p.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. 1. ed. Jundiaí: O autor, 2000. 285 p.

LAM, K. L.; KO, P. W.; WONG, J. K. Y.; CHAN, K. M. Metal Toxicity and Metallothionein Gene Expression Studies in Common Carp and Tilapia. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 46, p. 563-566, 1998.

LEHNINGER, A. L. **Príncipios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1990. 576 p.

LI, J.; QUABIUS, E. S.; WENDELAAR BONGA, S. E.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na^+/K^+-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 43, p. 1-11, 1998.

LICHTENFELS, A. J. F. C.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARÃES, E. T.; MACCHIONE, M.; SALDIVA, P. H. N. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 115, p. 47-60, 1996.

LINDE, A. R.; INÁCIO, A. F.; VIANA, T. A. P. Utilização de bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. In: CONGRESSO ACADÊMICO SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO DO RIO DE JANEIRO, 1., 2004, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 2004. 1 CD-ROM.

LIONETTO, M. G.; GIORDANO, M. E.; VILELLA, S.; SCHETTINO, T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 48, p. 561-571, 2000.

LLOYD, R. **Pollution and freshwater fish**. Oxford: The Buckland Foundation, 1992. 176 p.

LOCK, K.; CRIEL, P.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; Van EECKHOUT, H.; JANSSEN, C. R. Influence of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH on copper toxicity to barley (*Hordeum vulgare*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 68, p. 299-304, 2007.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 263-272.

LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de toxicologia aquática**. São Paulo: Instituto de Pesca. Disponível em: http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm. Acesso em: 12 nov. 2012.

LOVSHIN, L. L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 133-140.

MACINTOSH, MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistema aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 355-381, 2008.

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, London, v. 28, p. 361-368, 2012.

MASTRÁNGELO, M.; AFONSO, M.S.; FERRARI, L. Cadmium toxicity in tadpoles of *Rhinella arenarum* in relation to calcium and humic acids. **Ecotoxicology**, London, v. 20, p. 1225–1232, 2011.

MASUTTI, M. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; NOGUEIRA, A. M.; SIMÕES, F. C. F. Sensibilidade a cobre e cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2006.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 74, p. 351-364, 2005.

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, p. 797-804, 1999.

McGEER, J. C.; SZEBEDINSZKY, C.; McDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 50, p. 231-243, 2000a.

McGEER, J. C.; SZEBEDINSZKY, C.; McDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 50, p. 245-256, 2000b.

MOHAMED, M. M.; EL-FIKY, S. A.; SOHEIR, T. M.; ABEER, A. I. Cytogenetic Studies on the effects of copper sulfate and lead acetate pollution on *Oreochromis niloticus* fish. **Asian Journal of Cell Biology**, New York, v. 3, p. 51-60, 2008.

MOURA, E. E. S. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes.** 2009. 45 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL V.W. **Harper**: bioquímica. 8. ed. São Paulo: O Atheneu, 1998. 859 p.

NAIGAGA, I.; KAISER, H.; MULLER, W. J.; OJOK, L.; MBABAZI, D.; MAGEZI, G.; MUHUMUZA, E. Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. **Physics and Chemistry of the Earth**, Oxford, v. 36, p. 918-928, 2011.

NOGAMI, E. M.; KIMURA, C. C. M.; RODRIGUES, C.; MALAGUTTI, A. R.; LENZIC, E.; NOZAKI, J. Effects of dietary cadmium and its bioconcentration in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 45, p. 291-295, 2000.

NOREY, C. G.; BROWN, M. W.; CRYER, A.; KAY, J. A comparison of the accumulation, tissue distribution and secretion of cadmium in different species of freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, New York, v. 96, p. 181-184, 1990.

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

OLIVEIRA, C. P. F. **Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petroleira do Urucu – Am, sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818)**. 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2003.

PANKRATZ, T. M. **Environmental engineering dictionary and directory**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 2001.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Integrated physiological responses of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 32, p. 303–320, 1995.

PELGROM, S. M. G. J.; LAMERS, L. P. M.; GARRITSEN, J. A. M.; PELS, B. M.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus:* Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 30, p. 117-135, 1994.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 45, p. 17-23, 2002.

RAVANELLI, M. A. C. **Estudo da ecotoxicidade aguda em *Danio rerio* de um herbicida comercial e seus principais componentes diuron e hexazinona**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

RAYA-RODRIGUES, M. T. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: ZURITTA, M. L. L.; TOLFO, A. M. (Org.). **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000. p. 68-76.

REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; KRUG, F. J.; GINÉ, M. F. Development of a flow injection system with two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, p. 523-528, 1997.

REYNOLDSON, T. B.; DAY, K. E. Freshwater sediments. COLLOW, P. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. London: Blackwell Scientific Publication, 1993. p. 83-100.

RODRIGUES, L. H. R. **Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria**. 2002. 96p. Tese (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RODRIGUES, M. S. M.; ARRUDA, C. A. C.; NETTO, D. P.; TAJIRI, A. N. Verificação da contaminação por dimetoato e aldicarb em fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus)* coletados em dois frigoríficos do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, p. 907-914, 2009.

ROMAN, T. R. N.; LIMA, E. G.; AZOUBEL, R.; BATIGÁLIA, F. Toxicidade do cádmio no homem. **HB Científica**, São José do Rio Preto, v. 9, p. 43-48, 2002.

SAMPAIO, F. G. **Defesas antioxidantes e alterações bioquímicas no pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em resposta à exposição ao cobre, à hipóxia e ao meio ácido, isolados ou associados**. 2008. 180 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SÁNCHEZ, L. E. **Avaliação de impacto ambiental**: conceitos e métodos. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 495 p.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J. M.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p. 177-183, 2005.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. N.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M. V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas por biomarcação com 74 colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. (Ed.). **Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI**. São Carlos: RiMa, 2000. p. 147-164.

SOARES, S. S.; MARTINS, H.; GUTIÉRREZ-MERINO, C.; AURELIANO, M. Vanadium and cadmium *in vivo* effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, New York, v. 147, p. 168-178, 2008.

SORENSEN, E. M. B. **Metal poisoning in fish**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. **Bio**, Dartmouth, NS, v. 2, n. 3, p. 6-53, 1993.

SPRAGUE, J. B. Aquatic toxicology. In: SCHRENCH, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1990. p. 491-528.

SURA P, RISTIC N, BRONOWICKA P, WROBEL M. Cadmium toxicity related to cysteine metabolism and glutathione levels in frog *Rana ridibunda* tissues. **Comparative Biochemistry Physiology. Part C**, New York, v. 142, p. 128-35, 2006.

TAO, S.; LI, H.; LIU, C.; LAM, K. C. Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 46, p. 174-180, 2000a.

TAO, S.; LONG, A.; LIU, C.; DAWSON, R. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 47, p. 59-64, 2000b.

TAO, Y.; YUAN, Z.; XIAONA, H.; WEI, M. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 81, p. 55–64, 2012.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. 2003. Tese (Doutorado) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera) under different hardness conditions. **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Carlos, v. 15, p. 51-55, 2003.

TONISSI, F. B. **Bioensaios com metais (Cd, Cu e Zn) e as alterações em biomarcadores do estresse oxidativo, em brânquias, fígado e rins de *Oreochromis nilocticus*.** 2009. 143 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5. ed. Washington, DC, 2002.

VIJAYAVEL, K. Water chemistry influences the toxicity of silver to the green-lipped mussel *Perna viridis*. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 167, p. 289–295, 2010.

VISNJIC-JEFTIC, Z.; JARIC, I.; JOVANOVIC, L.; SKORIC, S.; SMEDEREVAC-LALIC, M.; NIKCEVIC, M.; LENHARDT, M. Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculate* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). **Microchemical Journal**, New York, v. 95, p. 341-344, 2010.

WILSON, R.; TAYLOR, E. The physiological responses of freshwater rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) during acutely lethal copper exposure. **Journal Comparative Physiology B**, New York, v. 163, p. 38-45, 1993a.

WILSON, R.; TAYLOR, E. Differential responses to copper in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to sea water and brackish ater. **Journal Comparative Physiology B**, New York, v. 163, p. 239-246, 1993b.

WITESKA, M.; KONDERA, E.; LIPIONOGA, J.; JASTRZEBSKA, A. Changes in oxygen consumption rate and red blood parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. after acute copper and cadmium exposures. **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, Germany, v. 19, p. 115-112, 2010.

WONG, C. K. C.; WONG, M. H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 48, p. 517-527, 2000.

WU, S. M.; LIN, H. C.; YANG, W. L. The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 87, p. 296–302, 2008.

WU, S. M.; SHIN, M.; HO, Y. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, New York, v. 145, p. 218-226, 2007.

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática –** princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In. POLI, C. R. **Aqüicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis: Multtarefa, 2004. p. 309-336.

ANEXOS

Anexo A – Tabela contendo as características nutricionais presentes na ração administrada aos organismos-teste durante os ensaios experimentais e período de aclimatação.

Níveis de Garantia por Kg do produto			Vitaminas Hidrossolúveis			Vitaminas Lipossolúveis			Minerais		
Umidade (máx.)	g/Kg	120,0	Vitamina C	mg/Kg	300,0	Vitamina A	UI/Kg	9000,0	Cobre	mg/Kg	25,0
Proteína Bruta (mín.)	g/Kg	320,0	Tiamina - B1	mg/Kg	20,25	Vitamina D3	UI/Kg	3150,0	Cobalto	mg/Kg	0,6
Extrato Etéreo (mín.)	g/Kg	60,0	Riboflavina - B2	mg/Kg	20,25	Vitamina E	mg/Kg	135,0	Ferro	mg/Kg	62,5
Fibra Bruta (máx.)	g/Kg	70,0	Piridoxina - B6	mg/Kg	20,25	Vitamina K3	mg/Kg	9,0	Iodo	mg/Kg	1,25
Matéria Mineral (máx.)	g/Kg	110,0	Pantotenato de Cálcio	mg/Kg	36,0				Magnésio	mg/Kg	31,25
Cálcio (mín.)	g/Kg	10,0	Niacina	mg/Kg	112,5				Manganês	mg/Kg	62,5
Cálcio (máx.)	g/Kg	30,0	Biotina	mg/Kg	0,585				Selênio	mg/Kg	0,25
Fósforo (mín.)	mg/Kg	6000,0	Ác. Fólico	mg/Kg	5,40				Zinco	mg/Kg	100,0
			Cianocobalamina - B12	µg/Kg	22,5						
			Inositol	mg/Kg	81,0						
			Colina	mg/Kg	800,0						

Anexo B – Tabela utilizada para o cálculo da amônia livre na solução, através da multiplicação do valor percentual desta tabela, em pH e temperatura adequada, pela concentração de amônia total presente na solução.

TABLE 10. PERCENT UNIONIZED NH_3 IN AQUEOUS AMMONIA SOLUTIONS: TEMPERATURES 15-26• C AND pH's 6.0-8.9[1]

pH	Temperature (°C)											
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
6.0	0.0274	0.0295	0.0318	0.0343	0.0369	0.0397	0.0427	0.0459	0.0493	0.0530	0.0568	0.0610
6.1	0.0345	0.0372	0.0400	0.0431	0.0464	0.0500	0.0537	0.0578	0.0621	0.0667	0.0716	0.0768
6.2	0.0434	0.0468	0.0504	0.0543	0.0584	0.0629	0.0676	0.0727	0.0781	0.0901	0.0901	0.0966
6.3	0.0546	0.0589	0.0634	0.0683	0.0736	0.0792	0.0851	0.0915	0.0983	0.1134	0.1134	0.1216
6.4	0.0687	0.0741	0.0799	0.0860	0.0926	0.0996	0.107	0.115	0.124	0.133	0.143	0.153
6.5	0.0865	0.0933	0.1005	0.1083	0.1166	0.1254	0.135	0.145	0.156	0.167	0.180	0.193
6.6	0.109	0.117	0.127	0.136	0.147	0.158	0.170	0.182	0.196	0.210	0.226	0.242
6.7	0.137	0.148	0.159	0.171	0.185	0.199	0.214	0.230	0.247	0.265	0.284	0.305
6.8	0.172	0.186	0.200	0.216	0.232	0.250	0.269	0.289	0.310	0.333	0.358	0.384
6.9	0.217	0.234	0.252	0.271	0.292	0.314	0.338	0.363	0.390	0.419	0.450	0.482
7.0	0.273	0.294	0.317	0.342	0.368	0.396	0.425	0.457	0.491	0.527	0.566	0.607
7.1	0.343	0.370	0.399	0.430	0.462	0.497	0.535	0.575	0.617	0.663	0.711	0.762
7.2	0.432	0.466	0.502	0.540	0.581	0.625	0.672	0.722	0.776	0.833	0.893	0.958
7.3	0.543	0.586	0.631	0.679	0.731	0.786	0.845	0.908	0.975	1.05	1.12	1.20
7.4	0.683	0.736	0.793	0.854	0.918	0.988	1.061	1.140	1.224	1.31	1.41	1.51
7.5	0.858	0.925	0.996	1.07	1.15	1.24	1.33	1.43	1.54	1.65	1.77	1.89
7.6	1.08	1.16	1.25	1.35	1.45	1.56	1.67	1.80	1.93	2.07	2.21	2.37
7.7	1.35	1.46	1.57	1.69	1.82	1.95	2.10	2.25	2.41	2.59	2.77	2.97
7.8	1.70	1.83	1.97	2.12	2.28	2.44	2.62	2.82	3.02	3.24	3.46	3.71
7.9	2.13	2.29	2.46	2.65	2.85	3.06	3.28	3.52	3.77	4.04	4.32	4.62
8.0	2.66	2.87	3.08	3.31	3.56	3.82	4.10	4.39	4.70	5.03	5.38	5.75
8.1	3.33	3.58	3.85	4.14	4.44	4.76	5.10	5.46	5.85	6.25	6.68	7.14
8.2	4.16	4.47	4.80	5.15	5.52	5.92	6.34	6.78	7.25	7.75	8.27	8.82
8.3	5.18	5.56	5.97	6.40	6.86	7.34	7.85	8.39	8.96	9.56	10.2	10.9
8.4	6.43	6.90	7.40	7.93	8.48	9.07	9.69	10.3	11.0	11.7	12.5	13.3
8.5	7.97	8.54	9.14	9.78	10.45	11.16	11.90	12.7	13.5	14.4	15.2	16.2
8.6	9.83	10.5	11.2	12.0	12.8	13.6	14.5	15.5	16.4	17.4	18.5	19.5
8.7	12.07	12.9	13.8	14.7	15.6	16.6	17.6	18.7	19.8	21.0	22.2	23.4
8.8	14.7	15.7	16.7	17.8	18.9	20.0	21.2	22.5	23.7	25.1	26.4	27.8
8.9	17.9	19.0	20.2	21.4	22.7	24.0	25.3	26.7	28.2	29.6	31.1	32.6

[1]Table provided by Teresa Norberg-King, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota. Also see Emerson, et. al., 1975, Thurston, et. al, 1974, and USEPA, 1985.