

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**Toxicidade do cobre sobre tambaqui
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)
em pH 4 e pH 8**

Ana Cristina Leite Menezes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação e Biologia Tropical de Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus – AM
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**Toxicidade do cobre sobre tambaqui
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)
em pH 4 e pH 8**

Ana Cristina Leite Menezes*

Orientador: Dr. Adalberto Luís Val

Co-orientador: Dr. Paulo Henrique Rocha Aride

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação e Biologia Tropical de Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Fontes financiadoras: CNPq, FAPAEM

* Bolsista do CNPq (processo nº. 130784/2003-6)

**Manaus – AM
2005**

Aos meus pais e irmãos,
pelo amor e apoio
que me dedicaram
para que eu pudesse
chegar até aqui

DEDICO

FICHA CATALOGRÁFICA

Menezes, Ana Cristina Leite.

Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8 / Ana Cristina Leite Menezes -- 2005. Manaus, AM, xii+71p.

Dissertação (Mestrado) - INPA/UFAM).

1.Cobre 2. Toxicologia 3. Desempenho natatório 4.Fisiologia
5.*Colossoma macropomum*

CDD 19.ed. 597.5041

SINOPSE

Este trabalho apresenta um estudo sobre influência do pH sobre a toxicidade do cobre em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Isto foi verificado com a determinação da concentração média letal em 96 horas (CL₅₀-96h) do cobre em pHs 4 e 8 para esta espécie e com a avaliação dos efeitos deste metal sobre os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e sobre a capacidade natatória do tambaqui após exposição a concentrações subletais. Foi observado que em pH 4, o comportamento tóxico do cobre apresentou-se reduzido. O cobre não afetou de forma letal quando em ambiente alcalino. Em concentrações subletais este metal em pH 4 afetou de forma significativa diversos parâmetros analisados, em relação a outros trabalhos descritos na literatura, o cobre apresentou valor de sua CL₅₀ elevado.

Palavras-chave: Cobre; Toxicologia; Desempenho natatório; Fisiologia; *Colossoma macropomum*

AGRADECIMENTO

A Deus pela vida e pela força nos momentos mais difíceis, pelas vitórias que foram sempre um incentivo para continuar em frente.

Ao Dr. Adalberto Luís Val, pelos ensinamentos e pela oportunidade que me concedeu para realizar este trabalho, o qual foi bastante gratificante fazê-lo e com certeza, fizeram-me crescer profissionalmente.

A Dra. Vera Maria F. de Almeida Val pelo incentivo e pelas palavras de carinho e confiança.

Ao Dr. Paulo Aride, pela força e incentivo, sobretudo quando mais precisei.

A Nazaré Paula da Silva que sempre fez o possível para o bom andamento de meu trabalho.

A equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Katherine, Roziete, Adriana, Rubens, Christiane, Nívia, Suely, Vivian, Hélio, Sandra, Juliana, Carolina, Luciana e Thiago e em especial aos meus “irmãos científicos” Alzira e Rafael, pela amizade e força. Com vocês foi possível a realização deste trabalho e ter os bons momentos que tivemos durante este período. Agradeço a Vilma Vilas, Marisa Castilho e Flávia Munin, pessoas com quem convivi pouco tempo, mas que são importantes para mim.

As minhas amigas do peito Mariângela, Monaliza e Kedma pela amizade sincera, respeito, carinho, paciência e presença em todos os momentos de minha vida, tenham sido eles bons ou ruins.

A equipe administrativa do Laboratório, Angélica Laredo e Zina Nascimento, duas pessoas abençoadas que Deus pôs em minha vida. Agradeço ainda à Raquel e Queulia.

Aos meus amigos do curso de BADPI turma de 2004, Rafaela, Ana Maria, Aprígio, Leocy, Renato, Suelen, Gilberto e Maeda, pela amizade pelos momentos de descontração que deixarão saudades.

Aos mestres, em especial ao professor Carlos Edwar, que muito contribuíram para meu crescimento como pessoa e profissional, tendo-os como exemplo de batalha e conquista.

A Carminha e Elany pelo carinho dedicado a todos nós, alunos do BADPI.

A Dra. Gercília Soares pela amizade e carinho.

A mestre Nívea Geovanna, ao Dr. Rodrigo Rouback, ao Sr. Itamar e ao Sr. Arnoldo pela ajuda na obtenção de peixes para meus experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a alcançar mais essa etapa da minha vida.

**Toxicity of copper on tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in
pH 4 and pH 8**

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the copper toxicity for the fish species *Colossoma macropomum* (tambaqui) in pH 4 and 8, to assess the bioconcentration and the exposition effects on hematological, ionic parameters and swimming performance of the animals. For this, the lethal concentration in 96 hours (LC₅₀) of copper in pH 4 was estimated in 2,68mg/L of Cu⁺². It was not possible to find the LC₅₀ to copper in pH 8 because there was no mortality in none of the experimented concentrations. After this phase, the animals were exposed to sublethal concentrations of this metal plus dissolved organic carbon (DOC) for 96 hours. Tambaqui exposure to these concentrations resulted in disturbs in hematological, ionic parameters, plasma metabolites and genotoxic alterations. However, the exposure does not cause changes in the activity of GST and CAT. An increase of copper levels in gills and liver was observed in exposed animals. So, copper had mild toxicity in pH 4 and no lethal effect was observed in animals exposed to pH 8. LC₅₀–96h in pH 4 is high in comparison to the average values reported in literature. Sublethal concentrations of copper were enough to affect the physiological and biochemical parameters, suggesting metabolic and ionic disturbances that can be attributed to copper presence in water. The addition of organic matter did not reduce the effects of copper on the exposed animals.

Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum*

(Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade do cobre para a espécie *Colossoma macropomum* em pH 4 e 8, assim como avaliar a bioconcentração e os efeitos da exposição à concentração subletal deste metal sobre os parâmetros hematológicos, iônicos e sobre a capacidade natatória dos animais. Para isso, foi determinada a concentração média letal em 96 horas (CL_{50-96h}) do cobre em pH 4, que foi estimada em 2,68mg/L de cobre. Não foi possível determinar a CL_{50} do cobre em pH 8, pois não houve mortalidade em nenhuma das concentrações utilizadas. Após essa etapa, os animais foram expostos a concentrações subletais (25 e 50% da CL_{50}) desse metal com e sem a adição de COD por 96 horas. A exposição a estas concentrações resultou em distúrbios nos parâmetros hematológicos, iônicos, metabólitos plasmáticos e alterações genotóxicas. No entanto, não causou variações nas atividades enzimáticas (GST e CAT). Com relação à bioconcentração do cobre nos tecidos, foi observado aumento nas brânquias e no fígado. Do exposto, o comportamento tóxico do cobre apresentou-se baixo em pH ácido e em pH 8 não houve nenhum efeito letal sobre os peixes. O valor obtido para a CL_{50-96h} do cobre em pH 4 neste estudo, é alto em relação aos valores médios mencionados na literatura. As concentrações subletais de cobre utilizadas foram suficientes para afetar diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, sugerindo distúrbios metabólicos e iônicos, que podem ser atribuídos à presença do cobre na água. Além disso, podemos salientar que a matéria orgânica utilizada neste trabalho não atuou para atenuar os efeitos do cobre sobre os animais expostos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A espécie <i>Colossoma macropomum</i>.....	6
1.2. Justificativa.....	7
1.3. Objetivo	9
1.3.1 Objetivos específicos.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Aquisição dos Animais.....	10
2.2 Protocolo experimental.....	10
2.2.1 Determinação da CL50 – 96 horas em diferentes pHs.....	10
2.2.2 Determinação dos efeitos das concentrações subletais de cobre em pH 4,0 com e sem adição de ácido húmico artificial (AHA).....	12
2.3 Acompanhamento das características físico-químicas da água.....	13
2.3.1 Dureza.....	13
2.4. Determinação da Ucrit.....	14
2.5. Coleta do sangue.....	14
2.6 Parâmetros Hematológicos	15
2.6.1 Hematócrito (Ht).....	15
2.6.2 Concentração de hemoglobina ([Hb]).....	15
2.6.3 Contagem do número de eritrócitos (RBC).....	16
2.6.4 Determinação das constantes corpusculares.....	16
2.6.5. Determinação da Taxa de Metahemoglobina (MetaHb).....	16
2.7. Parâmetros Iônicos.....	17
2.7.1 Concentração de K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ e Cl ⁻	17
2.8 Avaliação de Estresse.....	17
2.8.1. Glicose.....	17
2.8.2 Lactato plasmático.....	17
2.9 Avaliação de efeitos genotóxicos	18
2.9.1 Anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE).....	18
2.10 Avaliação das enzimas antioxidantes.....	19
2.10.1 Preparação dos homogenados.....	19
2.10.2. Glutathiona S-Transferase (GST).....	19
2.10.3. Catalase (CAT).....	20
2.10.4. Análise de Proteínas totais do tecido.....	20
2.11 Determinação do acúmulo do metal nos tecidos.....	20
2.12 Análise Estatística.....	21

3. RESULTADOS.....	22
3.1 CL50-96h de cobre em pH 4.....	22
3.2 CL50-96h de cobre em pH 8.....	25
3.3. Exposição às concentrações subletais de cobre em pH 4 com e sem adição de ácido húmico artificial (AHA).....	27
3.3.2. Determinação da Ucrit	28
3.3.3 Parâmetros hematológicos.....	29
3.3.5 Parâmetros iônicos.....	35
3.3.6 Avaliação de Estresse.....	38
3.3.7 Avaliação de efeitos genotóxicos (Anormalidades nucleares eritrocitárias).....	40
3.3.8 Avaliação das enzimas antioxidantes	41
3.3.9 Acúmulo de cobre nos tecidos	43
4. DISCUSSÃO.....	44
4.1 Exposição aguda ao cobre.....	44
4.2. Determinação da Ucrit	47
4.3 Parâmetros hematológicos.....	48
4.4 Parâmetros iônicos.....	51
4.5 Avaliação de estresse.....	53
4.6 Avaliação de efeitos genotóxicos (Anormalidades nucleares eritrocitárias).....	55
4.7 Análises enzimáticas antioxidantes.....	56
4.8 Determinação do acúmulo do metal nos tecidos.....	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

- AHA	Artificial humic acid
- ANE	Anormalidades nucleares eritrocíticas

- ATP	Adenosina trifosfato
- CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CL _{50-96h}	Concentração média letal em 96 horas
- COD	Carbono orgânico dissolvido
- Cu ⁺	Íon cuproso
- Cu ⁺²	Íon cobre (cúprico)
- Cu(OH) ₂	Hidróxido de cobre
- CuCO ₃	Carbonato de cobre
- CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
- DeoxyHb	deoxihemoglobina
- EDTA	ethylenodiaminotetracetic acid
- FerriHb	ferrihemoglobina
- H ⁺	Íon hidrogênio
- H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
- HCl	Ácido clorídrico
- HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
- HNO ₃	Ácido nítrico
- K ⁺	Íon potássio
- K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de potássio
- LaCl ₃	Cloreto de lantano
- LDH	Lactato desidrogenase
- mEq/L	Miliequivalente por litro
- MetaHb	Metahemoglobina
- Mg ⁺²	Íon magnésio
- mL	Mililitro
- MLB	Modelo do ligante biótico
-mmoles/L	Milimoles por litro
- N	Normalidade
- Na ⁺	Íon sódio
- NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
- Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Enzima sódio, potássio ATPase
- NaOH	Hidróxido de sódio
- MON	Matéria orgânica natural
- OH ⁻	Íon hidróxido
- OxyHb	oxihemoglobina
- PCA	Ácido perclórico
- PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
-pH	Potencial hidrogeniônico
- rpm	Rotações por minuto
- SEM	Erro padrão da média
- Tris	Trihidroxi-metilaminometano
- U _{crit}	Velocidade crítica de natação
- µg/g	Micrograma por grama
- µg/L	Micrograma por litro
- µmol/L	Micromole por litro

1. Introdução

A poluição das águas constitui um dos mais sérios problemas ecológicos da atualidade. As fontes de poluição da água decorrem, sobretudo, da atividade humana na forma de resíduos domésticos e industriais (Jardim, 1992), sendo estes últimos os principais responsáveis pela contaminação dos ambientes aquáticos por metais (Holt, 2000). Estes elementos lançados na água podem ser absorvidos por organismos aquáticos, como plantas (Brune & Dietz, 1995), moluscos (Klerks & Fraleigh, 1997) e peixes (Heath, 1995)

Os metais lançados no meio aquático, devido a processos industriais e aumento da exploração dos recursos naturais, incluem cádmio (Xie & Klerks, 2004), cromo (Jordão *et al.*, 1997) e cobre (Tao *et al.*, 1999; 2002). Devido a sua alta toxicidade, o cobre é um dos metais de maior interesse para o estudo do efeito da poluição sobre a fisiologia dos peixes (Lloyd, 1992). Este metal está freqüentemente presente na água doce como resultado do desgaste natural ou erosão do solo (Hodson *et al.*, 1979), das estações de esgoto (ATSDR, 1990), dos processos industriais e do uso agrícola na forma de sulfato de cobre como pesticida (Mazon *et al.*, 2002) e também como agente quimioterápico no controle de algas em estações de abastecimento de água e estações de piscicultura (Schlotfeldt, 1992; Menezes, 1998; Han *et al.*, 2001).

O cobre é considerado um elemento-traço essencial para o bom funcionamento do organismo (Sorensen, 1991), sendo cofator de vários sistemas enzimáticos (Mazon, 1997). É requerido por enzimas oxidativas como superóxido dismutase, catalase, peroxidase e citocromo oxidase (Nelson & Cox, 2000), na síntese de hemoglobina e está ligado à α -globulina (ceruloplasmina) no sangue, sendo transportado para rins, coração, sistema nervoso central, ossos e estocado principalmente no fígado

(Sorensen, 1991). Entretanto, em elevadas concentrações, este elemento pode ser extremamente tóxico para os organismos (Heath, 1995).

A toxicidade do cobre no ambiente aquático está intimamente relacionada à forma livre do metal no meio e ao tempo de exposição sobre os organismos (Pagenkopf, 1983). O cobre pode se apresentar sob diversas formas tóxicas como CuCO_3 , $\text{Cu}_2(\text{OH})^{+2}$, CuOH^+ e Cu^{+2} , sendo esta última considerada a mais tóxica (Howarth & Sprague, 1978). Nos peixes, no entanto, antes de ser transportado através das brânquias, o Cu^{+2} (íon cúprico) é aparentemente reduzido a Cu^+ (íon cuproso), sugerindo que esta forma seria a verdadeira responsável pelo efeito tóxico do metal (Grosell & Wood, 2002).

Os peixes podem acumular o cobre em diversos órgãos e tecidos de forma direta, a partir da água, ou indireta, por meio de alimentos (Seymore *et al.*, 1996), acúmulo este que acúmulo pode resultar em alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo. Com a finalidade de atenuar os efeitos ocasionados pela presença de metais (Heath, 1995), os organismos podem, por exemplo, hipersecretar muco nas brânquias e pele (Tao *et al.*, 2002).

As brânquias são o órgão alvo na toxicidade do cobre para os peixes, devido sua extensa área de superfície em contato direto com o ambiente aquático (Cerqueira & Fernandes, 2002). A ação do cobre causa alterações nos mecanismos de regulação iônica, iniciando com uma rápida diminuição nos eletrólitos plasmáticos devido à inibição do influxo de Na^+ e, conseqüentemente, a inibição da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias (Howarth & Sprague, 1978; Laurén & McDonald, 1985; 1987; Li *et al.*, 1996; 1998). Em concentrações mais elevadas, o cobre também atua na permeabilidade das junções paracelulares ao causar o deslocamento do cálcio (principal íon responsável pelo controle da permeabilidade branquial), favorecendo o

efluxo dos íons (Laurén & McDonald, 1985). A inibição do influxo de íons Na^+ e Cl^- branquiais, juntamente com o aumento do efluxo de Na^+ ocasiona a diminuição desses íons plasmáticos. Como consequência, a água presente no plasma flui para os tecidos, tornando o sangue concentrado, o que é agravado pela liberação de eritrócitos por contração do baço. A alta viscosidade sanguínea causa falhas no sistema circulatório do peixe, podendo levá-lo à morte (Wilson & Taylor, 1993).

Além dos distúrbios iônicos e hematológicos vistos anteriormente, peixes expostos ao cobre podem apresentar diversas respostas, tais como, danos histopatológicos nas brânquias e fígado (Mazon, 1997; Karan *et al.*, 1998; Mazon, *et al.*, 1999; 2002; Cerqueira & Fernandes, 2002), alterações no sistema imunológico (Mazon *et al.*, 2002) e efeitos citotóxicos (Roméo *et al.*, 2000) e genotóxicos, com a formação de micronúcleos e outras anormalidades nos núcleos dos eritrócitos (Sanchez-Gallan *et al.*, 1999).

Oliveira (2003) expôs a espécie *Colossoma macropomum* a 0,367mg/L de cobre por 96 horas e observou desequilíbrio iônico, aumento nos níveis de glicose, redução nos níveis de lactato e danos hepáticos. Além desses efeitos, foi comprovada a característica genotóxica deste metal com o aumento no percentual de anormalidades nucleares eritrocíticas. Assim, pode-se observar que a exposição ao cobre acarretou sérios efeitos sobre essa espécie.

Para a avaliação da toxicidade de uma substância, como o cobre, são realizados testes de toxicidade aguda, que consistem em determinar a sua concentração média letal (CL_{50}). Sprague (1990) define CL_{50} como a concentração de uma substância que causa a mortalidade de metade de um grupo de organismos num determinado tempo de exposição (de 24 a 96 horas). Esses testes, utilizados para avaliar a sensibilidade dos organismos aos metais, apresentam resultados que variam de acordo com os

parâmetros físicos e químicos da água e biológicos dos organismos (Di Toro *et al.*, 2001).

A toxicidade das substâncias aos organismos depende da concentração e das características ambientais que têm importante papel na especiação do cobre (Heath, 1995). Por isso, foi sugerido o Modelo do Ligante Biótico (BLM), cuja finalidade é avaliar a sensibilidade dos organismos, levando em consideração não só as características físicas e químicas da água, mas, também, o componente biológico que sofre com a toxicidade dos metais (Di Toro *et al.*, 2001; Paquin *et al.*, 1999). Este modelo teoriza que os ligantes abióticos, como os íons Ca^{2+} , H^+ e matéria orgânica natural (NOM), juntamente com o ligante biótico competem pelos metais existentes no meio. Considera-se, para os peixes, que este ligante biótico são as brânquias, mais especificamente, os canais iônicos de Na^+ e Ca^{+2} . Santore *et al.* (2001) propôs uma versão deste modelo para cobre, cuja idéia é que sua toxicidade sobre o peixe ocorre quando o acúmulo nas brânquias ultrapassa uma concentração crítica. Este modelo incorpora os fatores químicos da água que afetam a disponibilidade e a toxicidade do cobre para os organismos aquáticos como dureza, matéria orgânica dissolvida e pH.

O aumento da dureza da água reduz a toxicidade deste metal (Howarth & Sprague, 1978; Laurén & McDonald, 1985), pois a concentração de Ca^{+2} afeta a toxicidade do cobre nos peixes de água doce, de maneira que os efeitos nocivos deste metal aumentam em águas com baixa dureza. Isso ocorre porque o Ca^{+2} afeta a permeabilidade das brânquias e compete com o cobre pelos sítios de ligação neste órgão (Pagenkopf, 1983). Assim, o cálcio é considerado um importante mediador da acumulação e toxicidade do cobre em peixes (Hollis *et al.*, 1997).

A matéria orgânica dissolvida, também conhecida como matéria orgânica natural, carbono orgânico dissolvido, ácidos húmicos ou fúlvicos, é considerada o principal

mediador da toxicidade do cobre, pois apresenta efeito protetor ao alterar a sua especiação em águas naturais (Hering & Morel, 1988; Playle *et al.*, 1993). Isso ocorre porque a matéria orgânica dissolvida se liga ao metal e forma complexos reduzindo a sua forma livre (Cu^{+2}) (Playle *et al.*, 1992; Hollis *et al.*, 1997).

Águas ácidas podem ser extremamente prejudiciais aos peixes, pois segundo McDonald (1983), ocorre danos no epitélio branquial, como conseqüência do aumento na concentração de íons H^+ no meio, bem como, quando há um deslocamento dos íons de cálcio, ocasionando modificações no sistema de adesão celular do epitélio branquial, alterando sua permeabilidade e promovendo o efluxo de Na^+ e o influxo de H^+ (Milligan & Wood, 1982). A seqüência de eventos que causam a mortalidade de peixes em pH ácido mencionada por Milligan & Wood (1982) é bastante semelhante àquela descrita para o cobre (Wilson & Taylor, 1993). Assim, tal fato pode explicar como espécies tolerantes ao pH ácido têm apresentado também alta tolerância ao cobre, como a espécie *Colossoma macropomum* que apresentou CL_{50} de $735\mu\text{g/L}$ de Cu^{+2} (Oliveira, 2003), um valor bastante alto em relação aos valores encontrados para espécies de zona tropical como a espécie *Prochilodus scrofa*, cuja CL_{50} foi de $29\mu\text{g/L}$ (Mazon *et al.*, 1999) e de zona temperada como é o caso da espécie *Oncorhynchus mykiss*, que apresentou CL_{50} de $4,2\mu\text{g/L}$ de Cu (Cusimano *et al.*, 1986). No entanto, os experimentos com essa espécie foram realizados em águas com pH neutro, portanto, há a necessidade de verificar o verdadeiro efeito do pH ácido (4,0) sobre a toxicidade do cobre para a espécie *Colossoma macropomum*.

Estudos realizados acerca do efeito do pH sobre a toxicidade do cobre (Láuren & McDonald, 1985; 1986; Tao *et al.*, 2002) afirmam que a redução no pH pode aumentar a toxicidade do metal, pois em água com pH ácido, há um aumento na disponibilidade de

íons de cobre livre, aumentando a sua letalidade. O aumento na concentração de H^+ no meio favorece a dissolução de complexos, como o $Cu(OH)_2$, liberando o Cu^{+2} .

Laurén & McDonald (1985) expuseram a espécie *Salmo gairdneri* a concentrações de cobre que variaram de 12,5 a 200 μ g/L, durante 24 horas em pH 7,8 e 5,0. As perdas iônicas observadas quando os indivíduos foram expostos a baixas concentrações do metal (12,5 μ g/L) e pH ácido foram creditadas a um efeito somado do cobre com o pH. Mas isso, não ocorreu quando expuseram os animais a concentrações mais altas de cobre, pois não houve diferenças nos efeitos observados entre pH neutro e ácido. A explicação para isso é que o cobre pode deslocar o H^+ das superfícies branquiais e os efeitos causados no organismo passa a ser creditado somente ao cobre. Isso ocorre porque o cobre tem maior afinidade pelos sítios branquiais do que o H^+ (Playle *et al.*, 1993b).

Dessa forma, elevadas concentrações de cobre no ecossistema amazônico podem resultar numa condição altamente tóxica. Este efeito pode ser maximizado nas águas pretas da região, que são reconhecidamente pobres em íons e com valores baixos de pH, variando de 5,0 a 6,0 no Rio Negro e de 3,0 a 4,0 nos igapós, florestas inundadas por rios de água preta (Walker, 1995). Contudo, estudos recentes (Matsuo, 2004) mostram haver interação entre o cobre e a matéria orgânica que precisa ainda ser elucidada de maneira mais aprofundada.

1.1 A espécie *Colossoma macropomum*

Conhecida na Amazônia por tambaqui, a espécie *Colossoma macropomum* pertence à ordem Characiformes, família Serrasalminidae (Géry, 1977). Essa espécie é nativa da bacia amazônica, com hábito alimentar onívoro, podendo atingir até um metro de comprimento e pesar 30kg. Apresenta alto valor comercial e sua carne é bastante apreciada pela população local (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Com a finalidade de

preservar o meio ambiente, suprir a demanda crescente por proteína de origem animal e, sobretudo, devido ao seu fácil manejo, o tambaqui é uma das principais espécies produzidas comercialmente ou experimentalmente no país (Valenti *et al.*, 2000).

O tambaqui é uma espécie migradora; no entanto, a diferença na composição química e níveis de nutrientes entre as águas brancas e pretas, sobretudo quanto ao pH, aparentemente não representa obstáculo à migração desta espécie (Goulding, 1980). Os aspectos da fisiologia, genética, bioquímica e ecologia dessa espécie têm sido descritos por vários autores (Saint-Paul, 1988; Val & Almeida-Val, 1995; Wood *et al.*, 1998). Além disso, o tambaqui tem sido utilizado como espécie alvo em estudos com diversos tipos de agentes estressantes como pH (Wood *et al.*, 1998; Aride, 1998), hipóxia (Val, 1995), temperatura (Moura *et al.*, 1994; 1997; Oliveira *et al.*, 2001), petróleo e seus derivados (Costa *et al.*, 1996; Maco Garcia, 1997; Val, 1997; Val & Almeida-Val, 1999) e metais pesados como zinco (Matsuo *et al.*, 2001), alumínio (Matsuo & Val, 2003) e cobre (Menezes, 2002; Oliveira, 2003). Isso possibilita comparações com o estudo dos efeitos de sua exposição ao cobre em pH ácido. Além disso, o tambaqui é uma espécie de fácil manuseio e manutenção em laboratório. Todas essas características são consideradas por Sprague (1990) requisitos básicos para o estudo da toxicidade em laboratório.

1.2. Justificativa

Na Região Amazônica, o aumento da atividade no setor industrial, o aumento da exploração dos recursos naturais e a explosão no crescimento populacional têm acarretado um aporte crescente de efluentes no ambiente aquático. Dentre os efluentes, aqueles liberados pelos processos industriais apresentam elevada importância, pois são compostos por diferentes agentes tóxicos entre os quais, os metais. Assim, o conhecimento detalhado dos efeitos dos componentes individuais de um efluente é essencial para o controle da poluição.

A cidade de Manaus, no estado do Amazonas, tem sido motivo de grande preocupação, pois com o rápido desenvolvimento industrial, vem sofrendo com a contaminação e degradação de seus ecossistemas aquáticos. O principal exemplo desse processo é o Igarapé do Quarenta, drenando o Distrito Industrial e moradias ao longo do seu curso. De acordo com Sampaio (2000), que avaliou a contaminação por metais das águas e sedimentos deste igarapé, os níveis apresentados estão acima dos limites permitidos pela legislação ambiental. O cobre foi um dos metais que apresentou níveis bastante elevados, cerca de 1000µg/L.

Outro fator que tem contribuído para o aumento na contaminação por cobre é a crescente exploração dos recursos naturais, como a extração de petróleo. O petróleo extraído dos poços de perfuração vem carregado de gases tóxicos e água de formação. Há estimativa de que para cada barril de petróleo cru produzido, são produzidos até nove barris de água de formação (APECO, 1993). A água de formação é composta por altos níveis de íons dissolvidos e metais como cobre, sendo extremamente tóxica para os organismos aquáticos, sobretudo para os peixes.

A ampla diversidade íctica na região amazônica tem sido a causa de muitos questionamentos sobre os prováveis efeitos causados por metais em contato com os organismos aquáticos, já que altas concentrações das formas livres de certos metais, como o cobre, podem afetar a homeostase dos peixes (Wood, 2001). Esses efeitos podem ainda ser maximizados, sobretudo em águas amazônicas, devido a suas características peculiares como baixo pH e pobreza em íons (Walker, 1995).

Faz-se necessário o monitoramento dos níveis de metais presentes nos mananciais da região. Mas para que isso seja efetivo, são necessários estudos com marcadores biológicos relevantes. Os peixes são considerados excelentes bioindicadores de ambientes aquáticos, pois apresentam respostas variadas quando

expostos aos agentes tóxicos. A principal aplicação do uso dos peixes é a determinação da distribuição dos agentes tóxicos, como o cobre, bem como dos seus efeitos tóxicos sobre o ambiente aquático.

Estudos avaliando a toxicidade do cobre (Oliveira *et al.*, 2001; Menezes, 2002; Oliveira, 2003; Matsuo, 2004) foram realizados em espécies de peixes amazônicas; no entanto, não há, ainda, estudos acerca do efeito do pH sobre a toxicidade deste metal. Devido às características peculiares das águas amazônicas como pobreza em íons e baixos valores de pH, faz-se necessários estudos sobre a sensibilidade dessas espécies ao cobre em pH ácido. Em caso de contaminação nestes ambientes, mesmo para as espécies tolerantes a ambientes com pH ácido e ao cobre, é provável que o efeito do pH sobre a toxicidade deste metal, possa acarretar sérios distúrbios fisiológicos e comportamentais.

1.3. Objetivo

Avaliar o efeito dos pHs 4 e 8 sobre a toxicidade do cobre para a espécie *Colossoma macropomum*.

1.3.1 Objetivos específicos

1) Determinar a CL₅₀ do cobre em pH 4 e pH 8 para juvenis de *Colossoma macropomum*.

2) Avaliar a sensibilidade de tambaqui a concentrações subletais de cobre em água com pH 4 e pH 8 e com adição de matéria orgânica dissolvida, por meio da avaliação de seus efeitos sobre a capacidade respiratória, regulação iônica e capacidade natatória após a exposição às concentrações subletais.

3) Determinar o acúmulo de cobre nas brânquias, fígado e rim, após exposição às concentrações subletais.

2. Material e Métodos

2.1. Aquisição dos Animais

Os exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram adquiridos na Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueredo/Am). Os animais foram transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular–LEEM, CPEC/INPA, onde receberam tratamento profilático com NaCl 3% (Pavanelli *et al.*, 1999) por 24 horas, sendo então aclimatados em tanques de 3000L, com sistema de aeração constante e renovação diária de água. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial (26% de PB) até a saciedade e a alimentação era suspensa 48 horas antes do início dos experimentos.

2.2 Protocolo experimental

2.2.1 Determinação da CL₅₀ – 96 horas em diferentes pHs

Para a determinação da CL₅₀, os animais foram transferidos para tanques de 60 litros, com aeração constante e renovação de 10% da solução de cobre a cada 24 horas, caracterizando um sistema semi-estático. Após o período de aclimação de 24 horas, uma solução de ácido sulfúrico (0,03 N) foi preparada e gradativamente introduzida no tanque, até atingir o pH desejado (4,0). Os animais permaneceram neste pH durante 12 horas, antes da exposição ao cobre. O procedimento para a manutenção do pH desejado foi repetido durante todo o período experimental. Foram utilizados grupos de 10 exemplares, em triplicata, contendo indivíduos com peso médio de 45,65±0,4 g. Inicialmente, os exemplares foram submetidos à exposição aguda ao cobre na concentração de 0,73 mg/L em pH 4,0 por 96 horas. Este valor foi baseado no trabalho de Oliveira (2003) que determinou a CL₅₀ do cobre em pH neutro para a

espécie *Colossoma macropomum*. As demais concentrações testadas foram determinadas por meio da progressão geométrica, com a razão de 0,9 (Sprague, 1990). A cada 24 horas, os animais mortos foram retirados e substituídos por outros com peso e comprimento padrão próximos, devidamente marcados, a fim de manter a densidade nos aquários durante o período experimental.

Os valores para determinar a CL_{50} de cobre variaram entre 0,73 a 9,15 mg/L de Cu^{+2} . Os dados de mortalidade nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram tratados pelo programa computacional Spearman-Karber (Hamilton *et al.*, 1977) em função da concentração do metal dissolvido na água em pH 4,0 nos diferentes intervalos de tempo.

Foram realizados também experimentos para determinar a CL_{50} do cobre em pH 8. O procedimento para a manutenção do pH foi o mesmo aplicado para o pH 4, utilizando, desta vez, NaOH (0,1M) e as concentrações utilizadas também foram as mesmas, obedecendo a progressão geométrica de Sprague (1990). No entanto, como não houve mortalidade em nenhuma das concentrações, não foi possível determinar a CL_{50} do cobre neste pH.

Ao final dos experimentos, a água utilizada foi transferida para um tanque de 150L, onde foi adicionado carbonato de cálcio ($CaCO_3$), formando $CuCO_3$, que precipitou e decantou no fundo do tanque, sendo a água sobrenadante descartada. O metal precipitado foi acondicionado em recipientes plásticos para posterior descarte conforme as normas legais. O mesmo procedimento foi adotado ao final das demais etapas.

2.2.2 Determinação dos efeitos das concentrações subletais de cobre em pH 4,0 com e sem adição de ácido húmico artificial (AHA).

Após a determinação da CL_{50} do cobre em pH 4, foram avaliados os efeitos das concentrações subletais do cobre e com adição de ácido húmico artificial sobre os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e sobre a capacidade natatória de *Colossoma macropomum*.

O procedimento para a manutenção pH 4 foi o mesmo descrito na primeira etapa. Para cada tratamento foram utilizados 16 exemplares, alocados individualmente em câmaras experimentais de 4 litros. Com o auxílio de uma bomba de água submersa (ViaAqua, modelo VA2300), as câmaras recebiam água de um tanque de 76 litros, dotado de sistema semi-estático, isto é, com renovação de 10% da solução de sulfato de cobre a cada 24 horas. Dessa forma, o volume total em cada experimento foi de 140L, sendo o fluxo de água dentro de cada câmara cerca de 10mL/min. Os tratamentos consistiam em um grupo controle em pH 4 e duas situações com 25 e 50% da CL_{50} do cobre (0,67 e 1,14mg de Cu^{+2}/L), respectivamente.

Nos experimentos para avaliar o efeito do carbono orgânico dissolvido sobre a toxicidade do cobre foi utilizado ácido húmico artificial (AHA Sigma-Aldrich). A concentração utilizada foi de 5mg de COD/L. Para isso, foi preparada uma solução estoque, considerando que Aldrich humic acid é 44% de DOC de forma que a concentração de COD foi mantida durante todo o experimento. Para realizar os experimentos com a matéria orgânica artificial, foram feitos também três experimentos: um grupo controle em pH 4+AHA (5mg de COD/L) e duas situações com 25 e 50% da CL_{50} do cobre 0,67 e 1,14mg de Cu^{+2}/L), respectivamente.

Além disso, foi feito, ainda, um experimento em pH neutro, cujos animais utilizados não sofreram exposição tanto ao pH 4 como às concentrações subletais de cobre, mas somente ao estresse natatório, sendo utilizado como grupo controle geral.

Após as 96 horas de experimento, oito exemplares foram anestesiados para a coleta de amostras de sangue para a avaliação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e tiveram os tecidos coletados para a avaliação do acúmulo de cobre; enquanto os outros oito indivíduos foram transferidos para o túnel de natação para avaliar a sua capacidade natatória. Em seguida, estes últimos também foram anestesiados para a coleta de sangue e tecidos para a avaliação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e acúmulo de cobre.

2.3 Acompanhamento das características físico-químicas da água

O acompanhamento da qualidade de água (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) foi realizado diariamente em todos os experimentos. Os valores de pH foram obtidos por meio de um pHmetro digital (GEHAKA, modelo PG2000), a temperatura e oxigênio dissolvido foram obtidos com o auxílio de um oxímetro (YSI 55/12 FT). No início e final dos experimentos com as concentrações subletais, foram retiradas amostras de água para a determinação da dureza.

2.3.1 Dureza

A dureza da água foi estimada por meio de titulação direta, utilizando como titulante, o EDTA, considerado um quelante, que em condições adequadas de pH, forma complexos solúveis, extremamente estáveis com a maioria dos íons metálicos (APHA, 1985). Na titulação do íon metálico (complexo de Mg), após a solução ser tamponada ao pH apropriado (pH 10), é titulada diretamente com a solução padrão de

EDTA (0,004M) em presença do indicador Ericromo negro (ERIOD). Os valores estão expressos em mg/L CaCO₃.

2.4. Determinação da Ucrit

Este teste foi desenhado para determinar a velocidade crítica de natação (Ucrit). Por ser um teste de esforço, reflete o estado de saúde do animal, bem como sua capacidade anaeróbica. Estas condições estão intimamente relacionadas entre si e ao estado de estresse do animal. Ao final do período experimental das exposições às concentrações subletais, oito indivíduos foram submetidos ao túnel de natação, com sistema de circulação de água e com fluxo no sentido contrário ao da natação do peixe. Os animais permaneceram no túnel de natação por duas horas em um baixo fluxo de água (10cm/s) para aclimatação. Após este período, o fluxo foi aumentado a cada 40 minutos em 10cm/s, até que o peixe atingisse a fadiga. O tempo e a velocidade em que o peixe atinge à fadiga foram utilizados para calcular a Ucrit por meio da fórmula descrita por Brett (1964).

$$U_{crit} = u_i + (t_i / t_{iii} \times$$

onde:

u_i = última velocidade da natação na qual o peixe suportou nadar;

t_i = tempo em que o peixe fadigou;

t_{iii} = período de tempo estipulado para cada velocidade;

u_{iii} = incremento de velocidade.

2.5. Coleta do sangue

Após 96h de exposição às concentrações subletais, amostras de sangue dos animais foram obtidas por meio de punção da veia caudal com a utilização de seringas

heparinizadas. Para a separação do plasma, o sangue foi transferido para tubos de Eppendorf, e centrifugado (FANEM, NT-801) a 3000rpm por 10 minutos.

2.6 Parâmetros Hematológicos

2.6.1 Hematócrito (Ht)

As amostras de sangue foram colocadas em tubos de microhematócrito,, que tiveram uma das extremidades vedada com fogo e, em seguida, centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos (FANEN 211). A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi feita numa escala padronizada e os resultados expressos em porcentagem (%) de células sedimentadas.

2.6.2 Concentração de hemoglobina ([Hb])

A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada segundo o método da cianometahemoglobina, descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para tanto, 10 µL de sangue foram diluídos em 2 mL de reagente Drabkin (KCN 0,5 g; KH₂PO₄ 1,4 g; K₃[Fe(CN)₆] 2,0 g; 1 L de água destilada). Após agitação, os tubos permaneceram em repouso por 15 minutos para efetivação da hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de plástico e a absorbância das amostras foi determinada em comprimento de onda de 540nm em um espectrofotômetro Spectronic GENESIS 2. Os valores da concentração de hemoglobina são expressos em g/dL, calculados por meio da seguinte equação:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dL)} = \text{absorbância (540nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra}$$

2.6.3 Contagem do número de eritrócitos (RBC)

Para a contagem dos eritrócitos foram diluídos 10 µL de sangue em 2 mL de solução de formol citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2 mL de formol 40% e água destilada q.s.q. 100 mL) na proporção de 1:200 (v/v). Após a homogeneização, a contagem das células vermelhas circulantes (RBC) foi feita em uma câmara de Neubauer sob objetiva microscópica de 40 vezes. O número total de eritrócitos está expresso em milhões de células por milímetro cúbico ($\times 10^6/\text{mm}^3$) de sangue.

2.6.4 Determinação das constantes corpusculares

As constantes corpusculares (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) foram determinadas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, ao hematócrito e à concentração de hemoglobina, de acordo com as seguintes fórmulas estabelecidas por Brow (1976):

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = \text{Htx}10/\text{RBC}$$

$$\text{HCM } (\text{pg}) = [\text{Hb}]\times 10/\text{RBC}$$

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb}]/\text{Htx}100$$

2.6.5. Determinação da Taxa de Metahemoglobina (MetaHb)

A taxa de metahemoglobina foi determinada segundo o método descrito por Benesch *et al.* (1973). O método consiste na mistura de 25 µL de uma amostra de sangue em 1,5 mL de tampão fosfato 35mM, pH 7,3. A mistura foi agitada em um agitador automático de tubos e centrifugada (FANEM 204 NR) por 5 minutos a uma velocidade de 3000 rpm. A absorbância da mistura foi medida em um espectrofotômetro GENESIS-2, nos comprimentos de onda de 560, 576 e 630nm. A

determinação da taxa de metahemoglobina foi calculada a partir das fórmulas descritas a seguir, sendo o valor encontrado corrigido relativamente à concentração total de hemoglobina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

$$\text{OxyHb} = (\text{Abs.}576 \times (1,013) - \text{Abs.}630 \times (0,3269) - \text{Abs.}560 \times (0,7353)) \times 10^{-4}$$

$$\text{DeoxyHb} = (\text{Abs.}560 \times (1,373) + \text{Abs.}576 \times (0,747) - \text{Abs.}630 \times (0,37)) \times 10^{-4}$$

$$\text{FerriHb} = (\text{Abs.}630 \times (2,985) + \text{Abs.}576 \times (0,194) - \text{Abs.}560 \times (0,4023)) \times 10^{-4}$$

2.7. Parâmetros Iônicos

2.7.1 Concentração de K⁺, Ca²⁺, Mg⁺², Na⁺ e Cl⁻

A determinação das concentrações de sódio, potássio e cálcio no plasma foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica (Perkin Elmer, AANALYST 800), sendo os resultados obtidos expressos em mEq/L. A determinação da concentração de cloreto no plasma ocorreu de acordo com Zall *et al.* (1956), como descrito no item 2.4.1.1.

2.8 Avaliação de Estresse

2.8.1. Glicose

A concentração de glicose sanguínea foi determinada com auxílio de medidor de glicose sanguínea (Accu-Chek Advantage II). Para tanto, 10µl de sangue total foram colocados em fitas de leitura do aparelho que, por meio de uma análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em g/dL.

2.8.2 Lactato plasmático

Os níveis de lactato (ácido láctico) no plasma foram determinados segundo procedimento técnico da Sigma Chemical Co., utilizando o Kit 826 UV. O procedimento consiste em adicionar 100µL de plasma a 100µL de ácido perclórico (PCA 8%), a fim de desproteinizar as amostras. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e neutralizado com KOH 6M. O extrato do plasma foi adicionado a uma solução contendo 100UI/µL da enzima LDH (lactato desidrogenase), coenzima NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo, hidrazina e tampão glicina (0,6 moles/L, pH 9,2). Neste método, o lactato presente na amostra é convertido pela enzima LDH a piruvato com redução simultânea da coenzima NAD a NADH. O aumento na leitura de NADH é proporcional à conversão do lactato a piruvato e, portanto, indica a concentração de lactato originalmente presente na amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (GENESIS 2) em comprimento de onda de 340nm, sendo os resultados expressos em mmoles/L.

2.9 Avaliação de efeitos genotóxicos

2.9.1 Anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE)

Essa análise tem sido utilizada como biomarcador de contaminação por metais pesados (Sanches-Gallan *et al.*, 1999; 2001; Pacheco & Santos, 1998). A dosagem de efeitos genotóxicos é uma importante ferramenta na avaliação do comprometimento das estruturas celulares.

Os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol por 10 minutos e, depois de secos, foram corados com uma solução May-Grünwald por 2 minutos, May-Grünwald e água destilada 1:1 por 10 minutos e Giemsa e água destilada 1:6 por 10 minutos. Em seguida foram lavados com água destilada e secos à temperatura

ambiente (Sanches-Galan *et al.*, 1998). Segundo Carrasco *et al.* (1990), as lesões nucleares são divididas em quatro categorias: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K). Foram contadas 1000 células adultas de cada indivíduo com o auxílio de microscópio ótico da marca MOTIC com aumento de 100X. O resultado está expresso em porcentagem (%) de ANE, considerando a soma de todas as lesões (M+L+S+K).

2.10 Avaliação das enzimas antioxidantes

2.10.1 Preparação dos homogenados

Para as dosagens das enzimas Catalase e Glutathione-S-Transferase as amostras de fígado foram homogeneizadas, utilizando “Tissue Tearor” (Model 9985370), com tampão de homogeneização (Tris 20mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Sacarose 0,5M, KCl 0,15M e PMSF 0,1mM) numa proporção 1:4 (tecido tampão).

2.10.2. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi determinada pelo método descrito por Habig *et al.* (1974) e Habig & Jakoby (1981) utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1mM GSH (glutathione reduzida) e 1mM de CDNB (1-cloro-,4-dinitrobenzeno). A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340nm, em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção molar do CDNB e as unidades são expressas em $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

2.10.3. Catalase (CAT)

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 240nm (Aebi, 1984). Para tanto, foi preparado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10mM e tampão TE (Tris HCl 1M e EDTA 5mM), sendo as amostras diluídas 100x no tampão TE. Para leitura, 10 μ l de homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990 μ l de tampão de reação, misturadas por inversão e lidas em 240nm em um espectrofotômetro Shimadzu. Os resultados foram expressos em μ mol. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

2.10.4. Análise de Proteínas totais do tecido

A concentração de proteínas totais, no músculo, foi determinada pelo método do biureto modificado usando um “kit” comercial Doles. Tal procedimento consistiu em misturar 2,5ml do reagente de biureto com 50 μ l de homogeneizado da amostra, tendo como solução padrão a mistura de 2,5ml do reagente de biureto com 50 μ l de padrão. As soluções foram homogeneizadas e, em seguida, ficaram em repouso por 5min à temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro Spectronic Genesis-2 em 550nm. A concentração de proteínas nas amostras está expressa em g/dL.

2.11 Determinação do acúmulo do metal nos tecidos

Foram realizadas análises de acúmulo de cobre nas brânquias e no fígado. Amostras de brânquias e de fígado foram enxaguadas com EDTA (1mM) durante 30s para retirar o cobre externo que pode estar contaminando a amostra (vindo da água ou

do material de dissecação) e o excesso de água foi retirado com papel filtro. As amostras foram pesadas e digeridas com ácido nítrico 10% em estufa a 80°C por 24 horas. As amostras foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi diluída em HNO₃ 1% para leitura da concentração do metal. O volume de ácido nítrico 10% foi constante, sendo posteriormente calculada a diluição final da amostra digerida, pelo peso do tecido fresco. O total de cobre nas amostras foi medido por espectrofotometria de absorção atômica em forno grafite (Perkin-Elmer AANALYST 800). Os resultados são expressos em µg de cobre/g de peso fresco.

2.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão expressos como média e erro padrão da média (SEM). Para o cálculo da CL₅₀ foi aplicado o programa computacional “LC₅₀ Programs JS Pear Test” baseado no método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1978). Os resultados dos parâmetros analisados provenientes dos animais expostos às concentrações subletais do cobre em pH 4,0 e com AHA foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA). Quando houve indicação de diferença significativa em nível de 5%, foi aplicado o teste de Tukey para a discriminação das diferenças (Zar, 1984).

3. RESULTADOS

3.1 CL₅₀-96h de cobre em pH 4

Para a determinação da CL₅₀ de cobre em pH 4, os exemplares de *Colossoma macropomum* foram expostos a 0,73, 1,53, 2,09, 2,87, 6,00 e 9,15 mg de Cu⁺²/L por 96 horas obtendo valores de 0, 0, 0, 83, 100 e 100% de mortalidade, respectivamente.

De acordo com as mortalidades obtidas em cada uma das concentrações de Cu⁺², o valor da CL₅₀-96 horas em pH 4 estimado pelo programa computacional "LC₅₀ Programs JSPear Test" foi de 2,68 mg/L de Cu⁺² (figura 1). Esta figura mostra além da CL₅₀-96 horas, os valores das CL₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas também determinados por este programa, o que permitiu a observação de que, com o passar do tempo, o valor da CL₅₀ apresenta-se reduzido.

Nos últimos testes realizados para determinar a CL₅₀-96h de cobre em pH 4 para *Colossoma macropomum*, cujas concentrações foram de 6,00 e 9,15 mg/L de Cu⁺², observou-se mortalidade de todos os indivíduos expostos no período de 72 e 48 horas, respectivamente. Os indivíduos expostos a estas condições, apresentaram produção excessiva de muco, expansão do lábio inferior e natação próxima à coluna d'água. A produção de muco foi observada durante todos os experimentos, mesmo durante a aclimação em pH 4, antes da exposição ao agente químico.

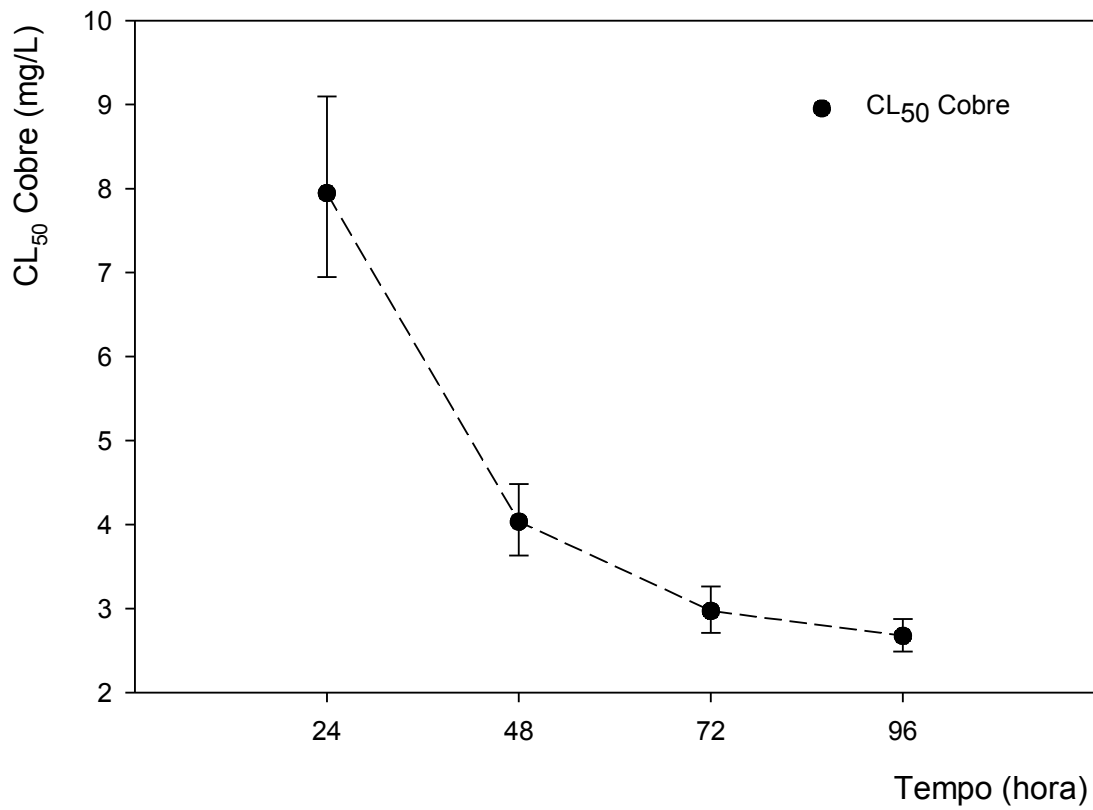


Figura 1. CL₅₀ -cobre em pH 4 para a espécie *C. macropomum* em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição e seus respectivos intervalos de confiança (95% superior e inferior).

Os parâmetros de qualidade da água que foram analisados nos experimentos podem ser observados na tabela 1. Os valores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis para a sobrevivência dos peixes, sem variações significativas, evitando, assim, as mortalidades causadas por mudanças severas destes parâmetros. Os valores de pH, observados nesta etapa do trabalho nos diferentes experimentos variaram entre 3,98 a 4,09. Estes valores estão de acordo com a faixa de pH mencionada por Wood *et al.* (1998) como tolerável para o tambaqui. A temperatura oscilou entre 26,06 e 27,43°C. Os níveis de oxigênio dissolvido variaram entre 5,59 e 6,42.

Tabela 1. Valores de parâmetros da qualidade de água utilizada nos testes de determinação de CL₅₀-96h de cobre em pH 4,0. Não houve diferenças significativas em comparação ao controle.

	Concentração (mg/L)	pH	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/L)
Cu ⁺²	Controle	4,06±0,07	26,65±0,3	6,15±0,267
	0,73	4,08±0,09	26,47±0,42	6,02±0,32
	1,53	4,04±0,1	26,39±0,45	6,09±0,3
	2,09	4,09±0,1	26,06±0,28	6,42±0,11
	2,87	3,99±0,08	26,70±0,21	6,27±0,31
	6,01	3,98±0,05	26,61±0,38	5,59±0,23
	9,15	4,01±0,11	27,43±0,35	6,09±0,10

3.2 CL₅₀-96h de cobre em pH 8

Além de determinar o valor da CL₅₀ do cobre em pH 4, este trabalho buscou também verificar o efeito tóxico do cobre em ambiente alcalino, de maneira que foram realizados testes para determinação de CL₅₀ do cobre em pH 8. Nesta condição, foi observada uma baixa toxicidade do cobre, já que não foi possível determinar a sua CL₅₀ em pH 8, pois o metal em altas concentrações precipitou e a espécie *C. macropomum* foi tolerante até então. Isso foi notório quando expostos a concentração de 9,15 mg/L de Cu⁺² em pH 4, os indivíduos apresentaram mortalidade de 100%, no período de 48 horas, o que não foi observado em pH 8, onde nenhum exemplar de tambaqui morreu em 96 horas de exposição.

Um fator interessante a ser mencionado para esta etapa foi a hipersecreção de muco ainda mais intensa do que aquela observada nos experimentos de determinação da CL₅₀-96 horas do cobre em pH 4. Os valores dos parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos limites que permitiram a sobrevivência dos indivíduos expostos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de parâmetros da qualidade de água utilizada nos testes de determinação de CL₅₀-96h de cobre em pH 8,0. Não houve diferenças significativas em comparação ao controle.

	Concentração (mg/L)	pH	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/L)
Cu ⁺²	Controle	8,03±0,06	26,43±0,22	6,07±0,33
	0,73	8,04±0,05	26,5±0,45	5,98±0,32
	1,53	8,05±0,04	26,5±0,4	6,08±0,27
	2,87	8,05±0,05	26,4±0,4	6,7±0,12
	6,01	8,03±0,05	26,82±0,18	6,62±0,2
	9,15	8,05±0,05	26,76±0,11	6,24±0,26

3.3. Exposição às concentrações subletais de cobre em pH 4 com e sem adição de ácido húmico artificial (AHA)

Após a determinação da CL_{50} para Cu^{+2} em pH 4, os exemplares de *C. macropomum* foram submetidos aos tratamentos mencionados anteriormente para a avaliação dos efeitos do cobre sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos e sobre a capacidade natatória de *Colossoma macropomum*. No final de cada uma dessas situações, foram coletados sangue e tecidos.

Durante todos os tratamentos foram anotados os valores dos parâmetros de qualidade de água de cada tratamento, que não apresentaram variações significativas (Tabela 3). Os valores de pH também permaneceram sem variações significativas mantendo-se na faixa tolerável por essa espécie. Os valores de temperatura variaram entre 26,7 e 27,3°C e o oxigênio dissolvido oscilou entre 6,0 e 6,8 mg/L. Os valores de dureza permaneceram entre 3,23 e 5,15mg de $CaCO_3/L$ (água muito mole).

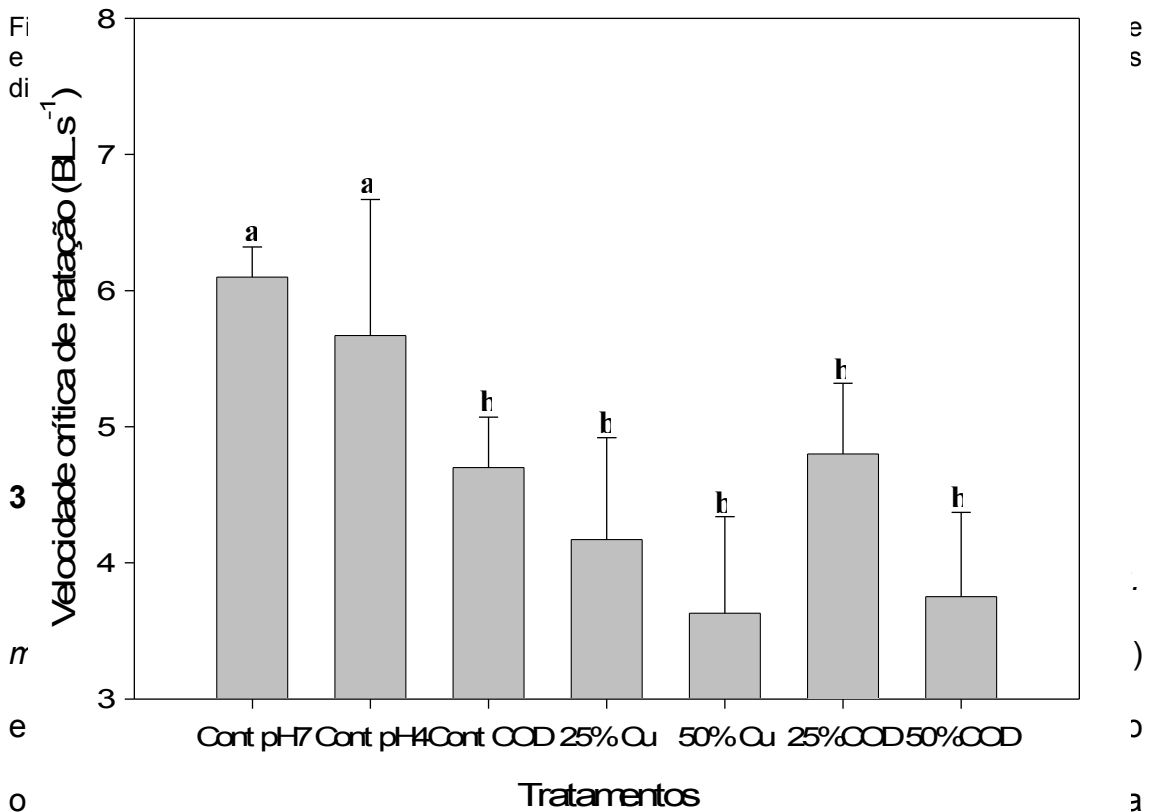
Não foram observadas mortalidades nos controles de pH 7 e pH 4, revelando a alta tolerância do *C. macropomum* a mudanças de pH da água, porém, no controle de pH 4 e COD houve mortalidade de 25% dos indivíduos. Nos tratamentos de 25 e 50% de cobre em pH 4 houve mortalidade de 6,25 e 18,75%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de parâmetros da qualidade de água utilizada nos testes de exposição a concentrações subletais de cobre por 96 horas em pH 4,0 para a espécie *Colossoma macropomum* (n significa o número de indivíduos).

Tratamentos	pH	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/L)	Dureza (mg/L de CaCO ₃)
Controle pH 7,0 (n=16)	7,01±0,23	26,68±0,3	6,59±0,06	4,41±0,07
Controle pH 4,0 (n=16)	4,08±0,09	26,98±0,53	6,61±0,26	3,33±0,10
Controle pH 4,0 + COD (n=12)	4,03±0,16	27,02±0,4	6,83±0,6	3,82±0,27
25%-CL ₅₀ de Cu ⁺² em pH 4,0 (n=15)	4,05±0,07	27,34±0,18	6,16±0,11	4,56±0,1
50%-CL ₅₀ de Cu ⁺² em pH 4,0 (n=13)	4,04±0,08	26,9±1,34	6,03±0,18	5,15±0,1
25%-CL ₅₀ de Cu ⁺² em pH 4,0 + COD (n=15)	4,07±0,06	27,48±0,46	7,59±0,22	3,23±0,3
50%-CL ₅₀ de Cu ⁺² em pH 4,0 + COD (n=15)	4,01±0,03	27,00±0,29	7,53±0,1	3,75±0,73

3.3.2. Determinação da Ucrit

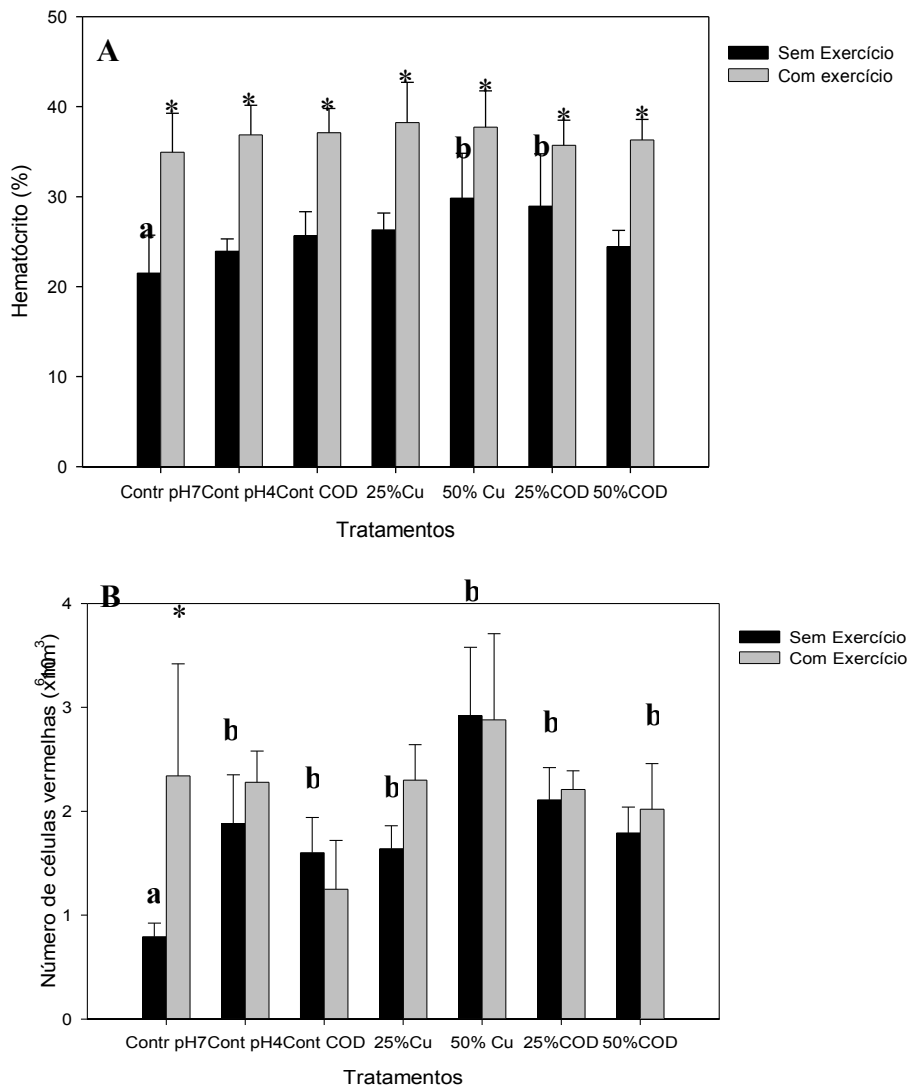
A velocidade crítica de natação (U_{crit}) para o tambaqui apresentou diferença estatística entre as situações e controle (Figura 2). A menor velocidade foi obtida para os animais expostos a 50% da CL_{50} de cobre em pH 4.



($p < 0,05$) com aumento significativo para os exemplares expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} e 25% da CL_{50} de Cu^{+2} com a adição de carbono orgânico dissolvido em relação ao controle (pH 7) (Figura 3A).

Os valores referentes ao número de eritrócitos (RBC) dos indivíduos do controle em pH7 foram os que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre aqueles que foram e os que não foram submetidos ao estresse natatório. Houve diferença ($p < 0,05$) com aumento significativo para todos experimentos em relação ao controle (pH 7), incluindo o controle em pH4 (Figura 3B).

Quanto aos níveis de hemoglobina, os indivíduos do grupo controle e expostos as concentrações subletais (25% da CL₅₀, 25% da CL₅₀ + COD e 50% da CL₅₀ + COD) submetidos ao estresse natatório apresentaram diferença significativa em relação aos indivíduos que não sofreram este estresse. Além disso, todos os indivíduos expostos às concentrações subletais de cobre apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle em pH 7 (Figura 3C).



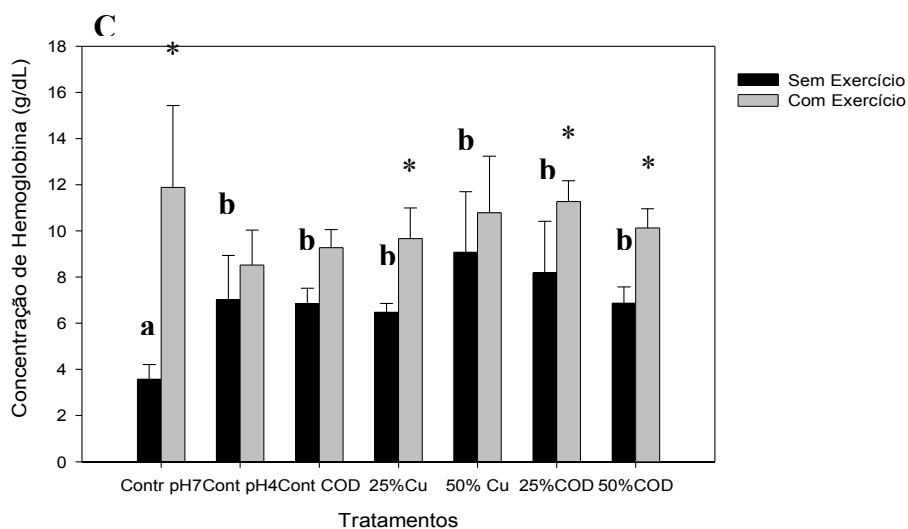


Figura 3. (A) Hematócrito (Ht); (B) Número de eritrócitos (RBC); (C) Concentração de hemoglobina ([Hb]) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. * Indica diferença estatística significativa entre os animais não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os níveis de metahemoglobina não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, tanto para os indivíduos submetidos como para os não submetidos ao estresse natatório, em relação ao grupo controle (Figura 4).

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), calculados a partir dos índices hematológicos fundamentais (Ht, Hb e RBC), apresentaram diferença estatística entre as diferentes situações e o controle (Figura 5). Os valores de VCM apresentaram-se diferentes com diminuição significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos do grupo controle submetidos ao estresse natatório em relação aos não submetidos. Foi observado ainda que os indivíduos do controle com adição de COD submetidos ao estresse natatório apresentaram aumento significativo em relação aos não submetidos e, em todos os tratamentos, os animais apresentaram diminuição significativa desse parâmetro em relação ao controle (Figura 5A). A respeito dos valores de HCM, foi observado um aumento com diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre os indivíduos do grupo controle com COD submetidos ao estresse em relação àqueles que não foram, e ainda, houve diferença com aumento significativo ($p < 0,05$) entre o grupo controle com adição de COD em relação ao controle (pH7) (Figura 5B). Com relação aos níveis de CHCM, os indivíduos do grupo controle em pH 7 foram os únicos que apresentaram aumento com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os submetidos ao estresse e os que não foram, mas quanto a comparação entre os tratamentos, todos apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 5C).

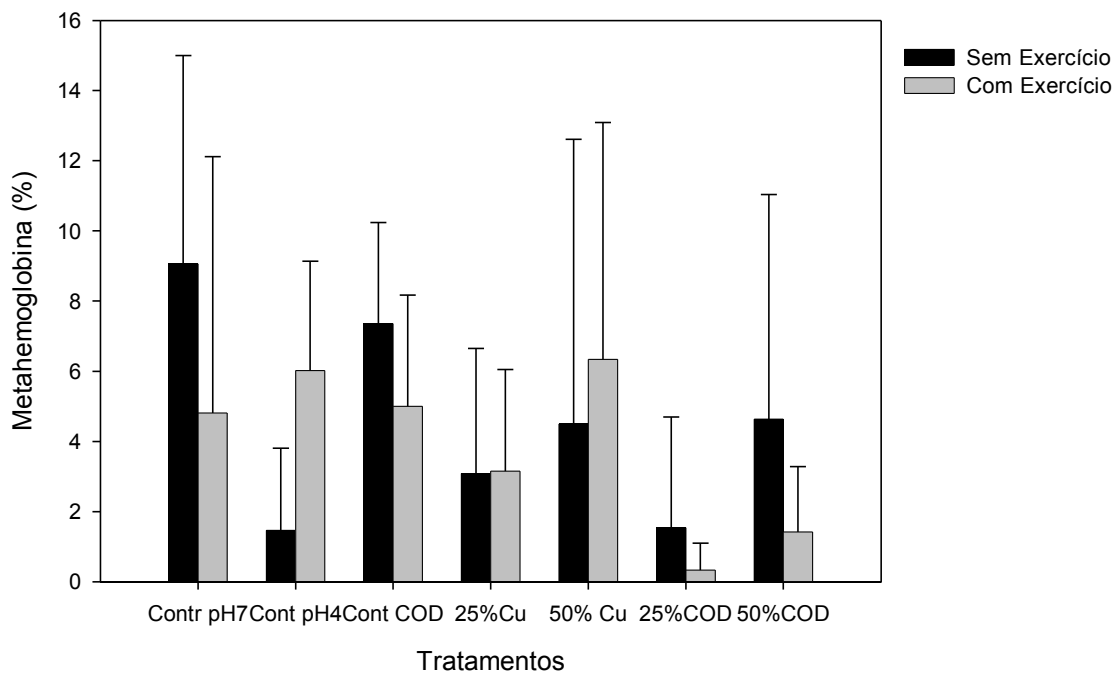


Figura 4. Níveis de metahemoglobina de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. * Indica diferença estatística significativa entre os animais não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles

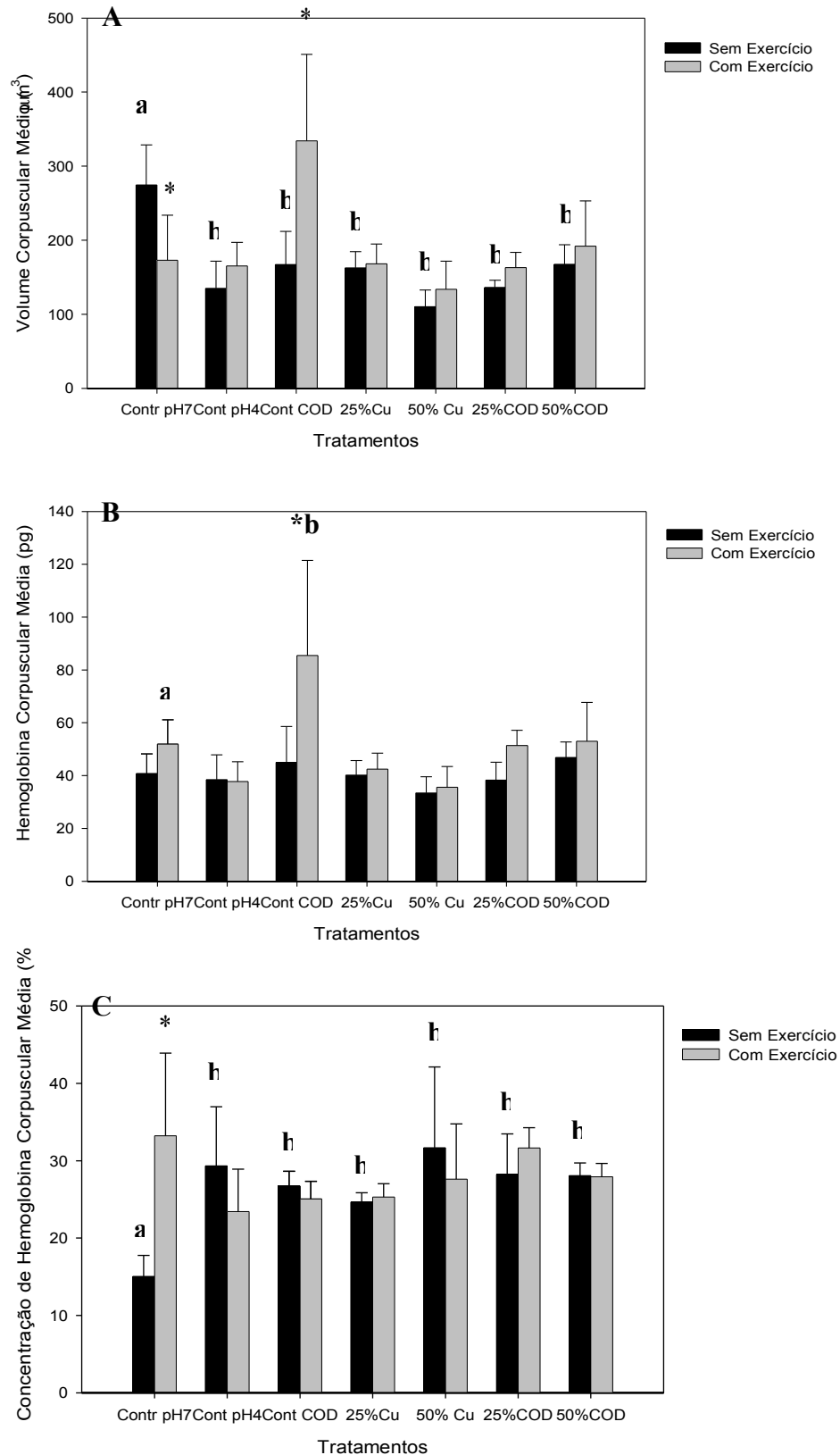


Figura 5. (A) Volume corpuscular médio (VCM); (B) Hemoglobina corpuscular média (HCM); (C) Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. * Indica diferença estatística significativa entre os animais não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles.

3.3.5 Parâmetros iônicos

As concentrações dos íons K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ e Cl^- do plasma dos exemplares de tambaqui do grupo controle e das concentrações subletais de cobre e com adição de carbono orgânico dissolvido estão apresentados nas figuras 6 e 7. Nos níveis de potássio plasmático, observou-se um aumento significativo entre os indivíduos submetidos e não submetidos ao estresse natatório nos grupos controle pH 7 e 50% da CL_{50} de Cu^{+2} . Houve, também, um aumento significativo ($p < 0,05$) entre os indivíduos da concentração subletal (25% da CL_{50} de Cu^{+2} + COD) e o controle (Figura 6A). Quanto à concentração de Ca^{+2} no plasma, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os exemplares que sofreram estresse natatório e os que não sofreram, em todos os tratamentos. No entanto, observou-se um aumento significativo entre os indivíduos expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} (Figura 6B). Para os níveis de Mg^{+2} foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos indivíduos expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} + COD em relação ao controle (pH 7), tanto para os indivíduos submetidos ao estresse, como para os não submetidos (Figura 6C). A concentração de Na^+ no plasma não apresentou diferença significativa para nenhum dos tratamentos em relação ao controle, tampouco, entre os indivíduos submetidos ao estresse e os não submetidos (Figura 7A). Quanto aos níveis de cloreto no plasma, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os indivíduos expostos ao estresse natatório e os não expostos em todos os tratamentos. Mas foram observadas diferenças com aumento significativo ($p < 0,05$) entre os indivíduos expostos a 25% da CL_{50} de Cu^{+2} + COD em relação ao controle (Figura 7B).

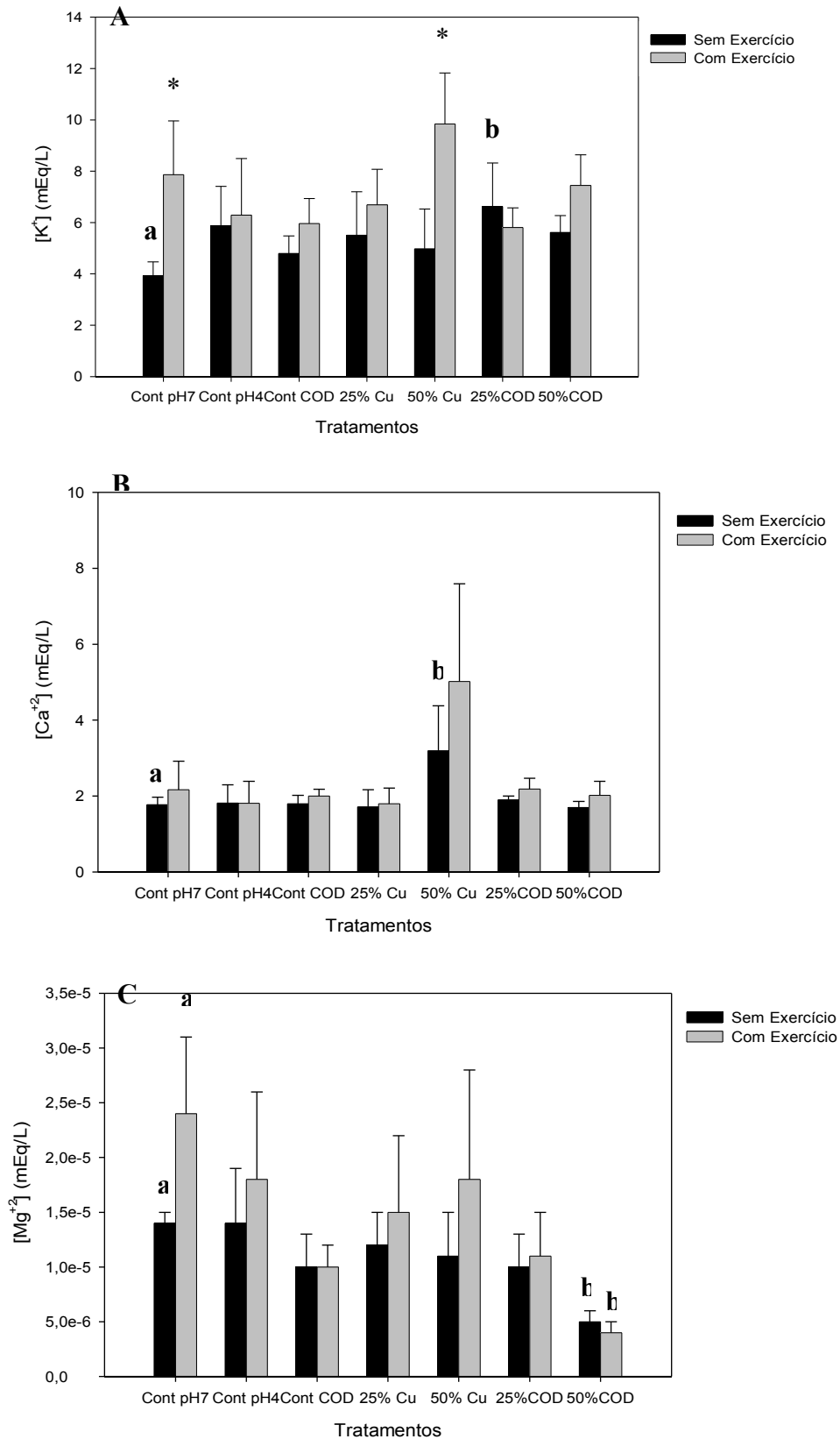


Figura 6. (A) Potássio (K⁺); (B) Cálcio (Ca²⁺); (C) Magnésio (Mg²⁺) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu²⁺, no período de 96 horas. * Indica diferença estatística significativa entre os animais não submetidos ou submetidos ao estresse natatório (p<0,05) e letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) em relação aos controles

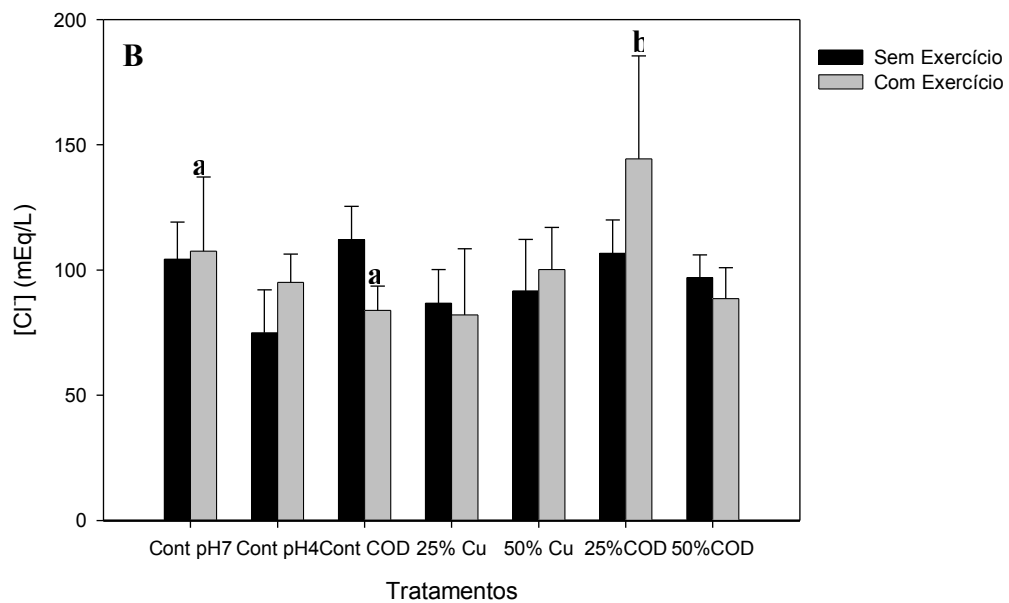
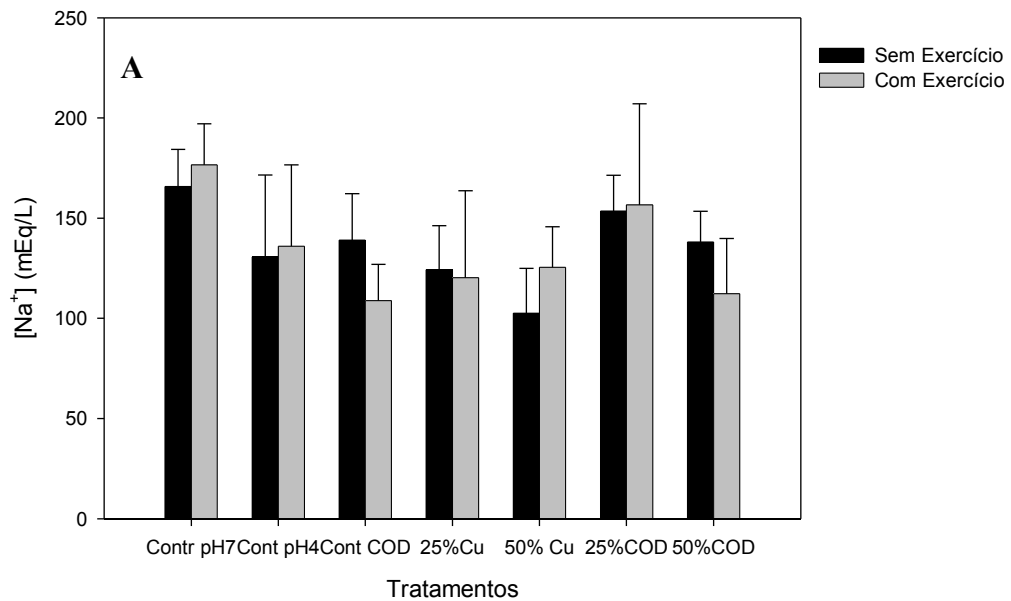


Figura 7. (A) Sódio (Na^+); (B) Cloreto (Cl^-) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles

3.3.6 Avaliação de Estresse

As concentrações de glicose aumentaram ($p < 0,05$) nos animais submetidos ao estresse natatório em todos os tratamentos. Foi observado, também, aumento com diferença significativa ($p < 0,05$) nos indivíduos expostos a todas as concentrações subletais e aquelas com adição de COD em relação ao grupo controle de pH 7 (Figura 8A).

Porém para os níveis de lactato só foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os indivíduos submetidos ao túnel de natação para todos os tratamentos, (Figura 8B).

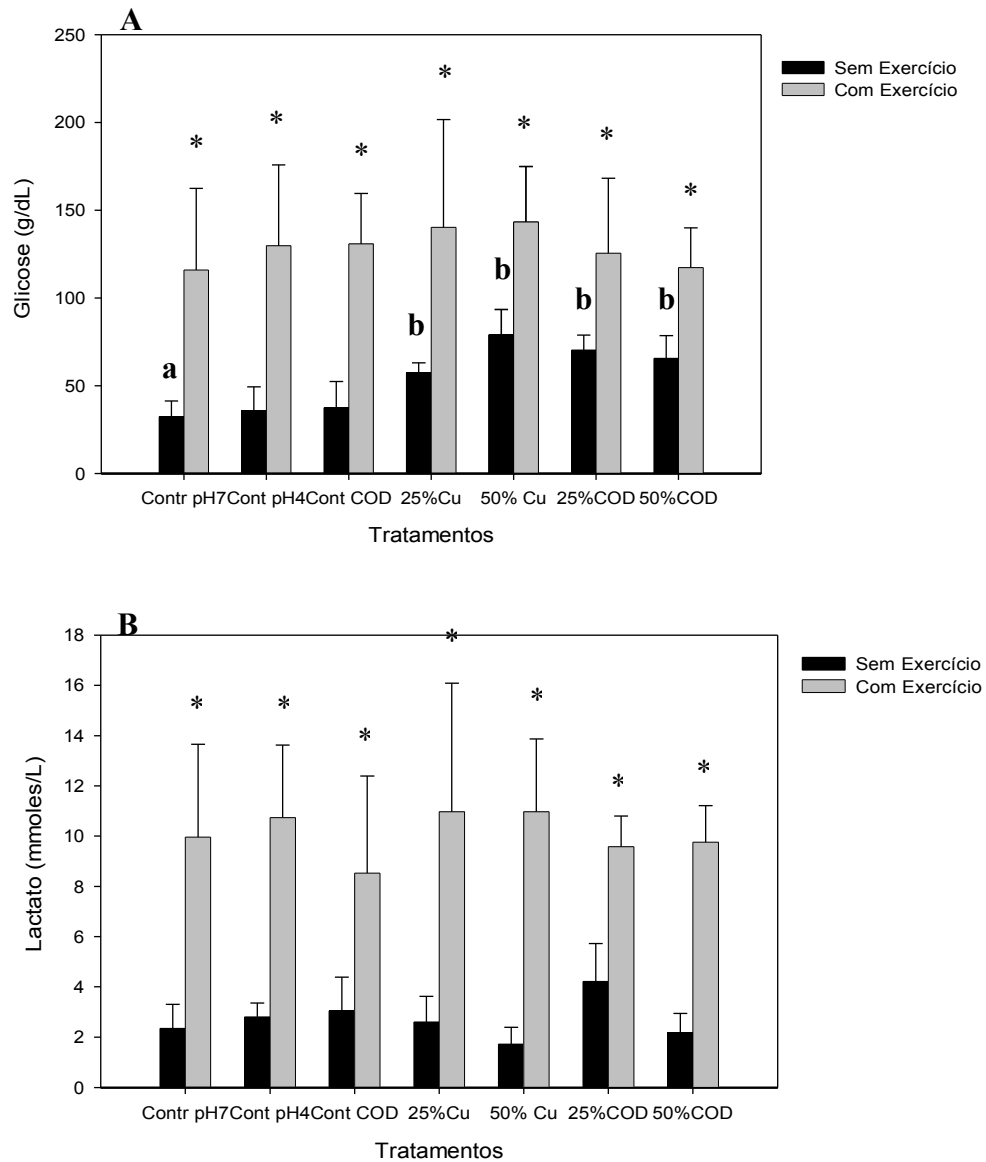


Figura 8. (A) Níveis de Glicose e (B) níveis de Lactato de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. * Indica diferença estatística significativa entre os animais não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles

3.3.7 Avaliação de efeitos genotóxicos (Anormalidades nucleares eritrocitárias)

As anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) observadas nos exemplares de *C. macropomum* do grupo controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} por 96 horas estão mostradas na figura 8. O percentual das ANE aumentou ($p < 0,05$) nos grupos expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} e 50% da CL_{50} de $\text{Cu}^{+2} + \text{COD}$ em comparação ao grupo controle. Não foram, entretanto, observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os indivíduos submetidos ao estresse natatório em relação aos não submetidos (figura 9).

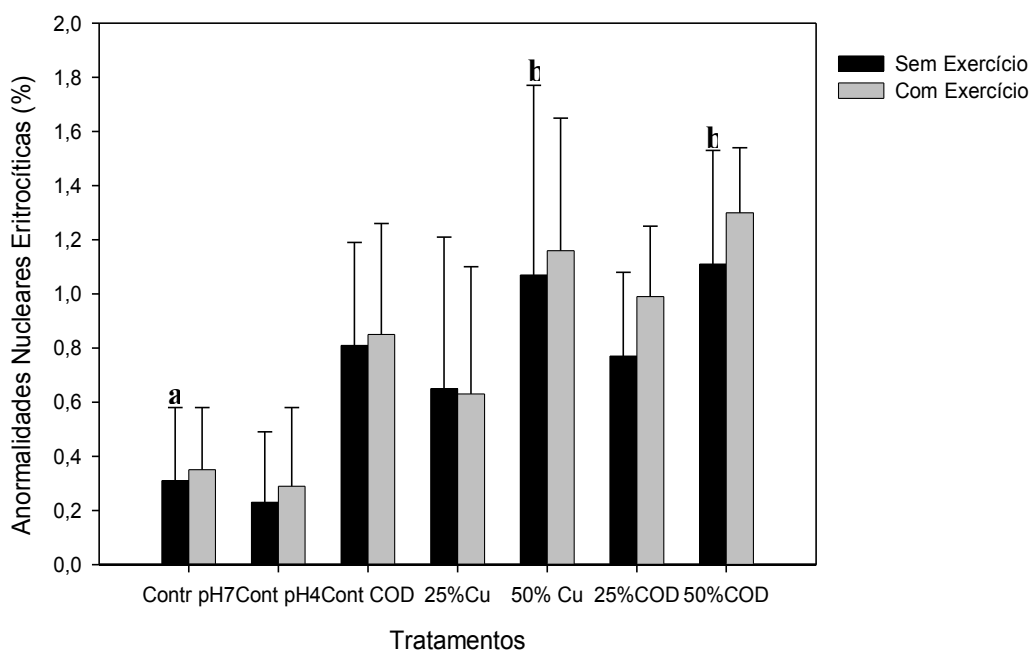


Figura 9. Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) de exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles.

3.3.8 Avaliação das enzimas antioxidantes

A avaliação das concentrações das enzimas Glutathione S-Transferase (GST) e Catalase (CAT) (Figura 10) foram utilizadas para inferir os efeitos tóxicos causadas pela exposição do cobre, sobre o fígado de *C. macropomum*. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas para os indivíduos submetidos ao estresse natatório em relação aos demais não submetidos, como também não observou-se diferenças entre os tratamentos e o controle (Figura 10A).

Semelhante à atividade da GST, a atividade da CAT nos animais que foram expostos ao estresse natatório apresenta-se sem diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 9B), assim como os indivíduos submetidos às concentrações subletais e o controle (Figura 10B).

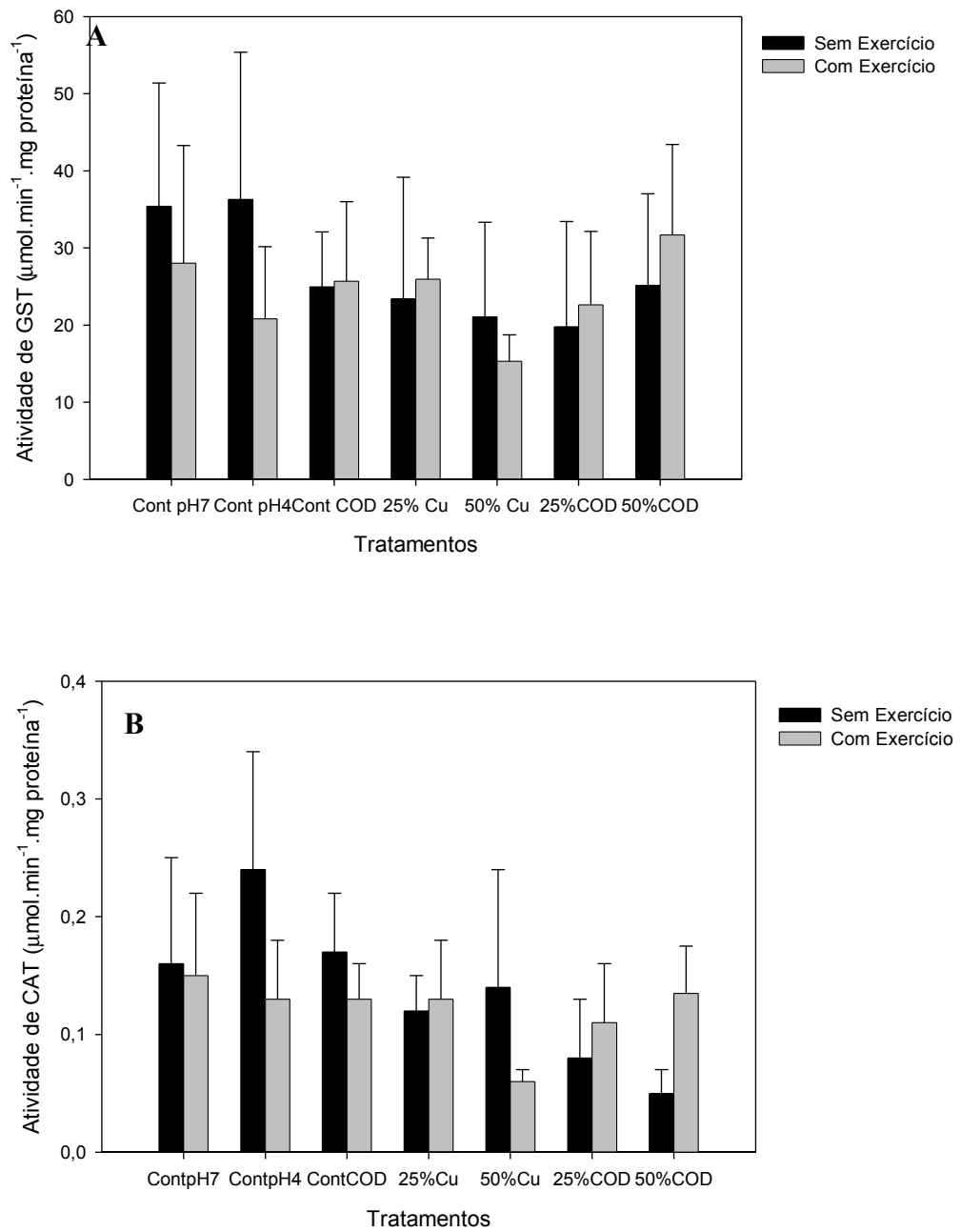


Figura 10. (A) Atividade de Glutaciona S-Transferase (GST) e (B) atividade de Catalase (CAT) em exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles

3.3.9 Acúmulo de cobre nos tecidos

A bioconcentração do íon Cu^{+2} nos tecidos de *C. macropomum* estão apresentados na Figura 11. Foi verificado aumento ($p < 0,05$) na concentração de Cu^{+2} nas brânquias em todos os tratamentos em relação ao controle em pH 7, incluindo o controle com adição de COD. O mesmo foi observado para a concentração de Cu^{+2} no fígado, onde foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) entre as concentrações subletais e o controle em pH 7. Porém, não houve diferença significativa na concentração deste metal no rim dos indivíduos expostos às concentrações subletais em relação ao controle.

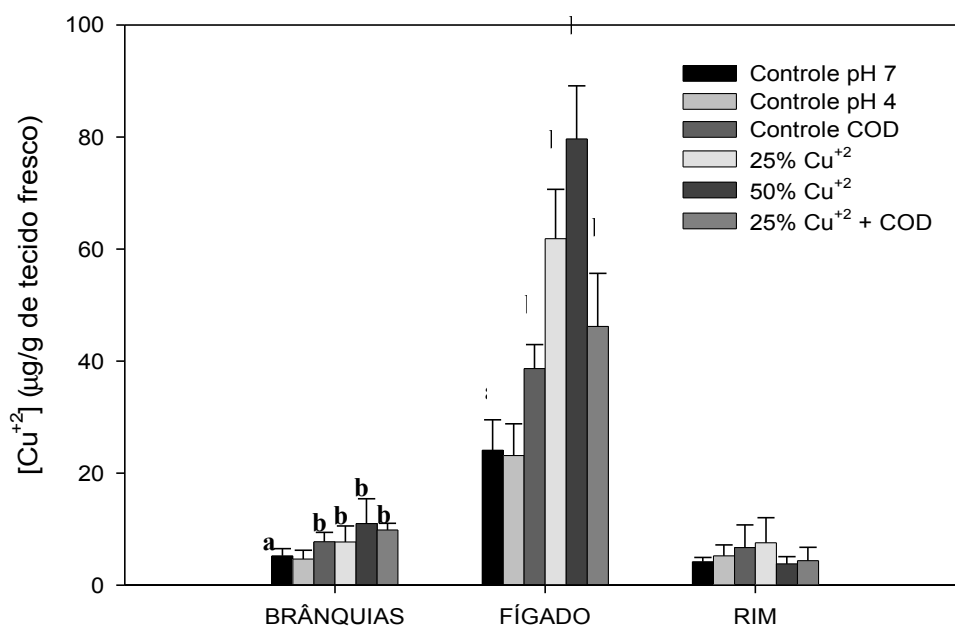


Figura 11. Acúmulo de cobre em brânquias, fígado e rim em exemplares de *C. macropomum* dos grupos controle e dos grupos expostos às concentrações subletais de Cu^{+2} , no período de 96 horas. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles

4. DISCUSSÃO

4.1 Exposição aguda ao cobre

A toxicidade do cobre tem sido estudada e avaliada em diversas espécies, sendo a maioria destes estudos realizados com espécies de clima temperado como *Cyprinus carpio* (Karan *et al.*, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Marr *et al.*, 1998) e *Sparus sarba* (Wong *et al.*, 1999); com algumas espécies tropicais *Prochilodus scrofa* (Mazon & Fernandes, 1999), *Hyphessobrycon callistus* (Damato, 1997) e com as espécies amazônicas *Hoplosternum littorale* (Oliveira, 2001) e *C. macropomum* (Oliveira, 2003). Além disso, a maior parte dos trabalhos foi realizada em pH neutro, dentre os poucos trabalhos realizados com pH ácido, está o estudo com a espécie de clima temperado *Oncorhynchus mykiss* (Cusimano *et al.*, 1986); e a espécie tropical *Prochilodus scrofa* (Carvalho *et al.*, 2004; Takasusuki *et al.* 2004).

Heath (1995) reporta que alterações nas condições ambientais ocasionam variações comportamentais dos indivíduos expostos, associados a ajustes bioquímicos e fisiológicos. Em ambientes ácidos, a forma mais biodisponível do cobre é o cátion livre (Cu^{+2}) (Tao *et al.*, 2000ab; Láuren & McDonald, 1985; 1986; Tao *et al.*, 2002) que é considerada a forma mais tóxica para os peixes (Howarth

& Sprague, 1978); já em água com pH alcalino, a forma mais biodisponível é o complexo de hidróxido de cobre ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) (Playle *et al.*, 1992; Tao *et al.*, 2002). Por isso, é esperada maior toxicidade do cobre em pH ácido e menor em pH alcalino.

Os resultados deste trabalho mostram que a toxicidade do cobre foi reduzida com a diminuição do pH, e foi menor ainda quando houve o aumento do pH. A espécie *C. macropomum* ao ser exposta ao cobre em pH 4 por 96 horas, apresentou valor de CL_{50} de 2,68mg/L, e este quando comparado ao encontrado em pH neutro, cuja CL_{50} foi de 0,735 mg/L (Oliveira, 2003), apresentou um aumento de quase quatro vezes. Os resultados obtidos neste trabalho foram diferentes dos encontrados para *Prochilodus scrofa* (Takasusuki *et al.*, 2004) que apresentou maior sensibilidade ao cobre em pH 8 (15 $\mu\text{g/L}$), se comparada com o valor da CL_{50} em pH 4 (200 $\mu\text{g/L}$) e a Carvalho *et al.* (2004), que também utilizaram esta espécie e encontraram um valor para a CL_{50} de 98 $\mu\text{g/L}$. Esta baixa toxicidade do cobre em pH 4 para o presente trabalho pode ser explicada pelo fato de que em um ambiente ácido, há uma alta concentração de íons hidrogênio, que compete com o íon cúprico (Cu^{+2}) pelos mesmos sítios nos epitélios branquiais (Laurén & McDonald, 1985).

Com relação aos experimentos com pH 8, não foi possível determinar o valor da CL_{50} de cobre para a espécie *C. macropomum*, pois não foi observada mortalidade em nenhuma das concentrações utilizadas. Nesse caso, a ausência de toxicidade do cobre pode ser explicada pela diminuição da solubilidade do metal, o que também foi observado no trabalho de Tao *et al.* (2002), além de uma produção excessiva de muco. Esta hipersecreção de muco tem sido citada em peixes expostos ao cobre em pH ácido e alcalino, como na espécie *Prochilodus*

scrofa (Takasusuki *et al.*, 2004), que apresentou maior produção em pH 8 do que em pH 4,5. No presente estudo, foi observada uma hipersecreção de muco, para o tambaqui, durante a etapa de determinação da CL₅₀ do cobre tanto em pH 4 quanto em pH 8, sendo que nesta última situação, ocorreu produção de muco mais intensa.

Exposição aguda a metais ativa a hipersecreção de muco nas brânquias, que serve como um importante mecanismo de proteção contra a absorção dos metais (McDonald & Wood, 1993) por meio da quelação (formação de complexo com o cobre de forma a reduzir sua toxicidade) e inibição de difusão (revisto por Heath, 1995). Porém, esse mesmo mecanismo benéfico para reduzir o efeito tóxico do contaminante, acaba sendo prejudicial para o peixe, pois pode impedir as trocas gasosas, levando o indivíduo à hipoxia (Lichtenfels *et al.*, 1996) e, também, causar desordem na osmoregulação e na regulação iônica (Heath, 1995).

Em situações de hipoxia, o tambaqui apresenta uma expansão labial tentando captar oxigênio na camada superficial da coluna de água (Almeida-Val & Val, 1995); entretanto, apesar de neste estudo os níveis de oxigênio permanecerem normais, foi observado o mesmo comportamento para esta espécie sugerindo que este pode ter sido influenciado pelo ambiente ácido e/ou pelo cobre.

Segundo Sprague (1990), a maioria dos peixes é afetada da mesma maneira pelos mesmos agentes tóxicos ainda que alguns sejam mais sensíveis do que outros. A espécie *C. macropomum* apresentou baixa sensibilidade ao cobre (2,68mg/L) em pH 4 se comparado com outras espécies expostas às mesmas condições (cobre em pH ácido), como *Prochilodus scrofa* (98µg/L)

(Carvalho *et al.*, 2004) e *Oncorhynchus mykiss* (4,2µg/L) (Cusimano *et al.*, 1986) apesar de também apresentar uma alta secreção de muco quando exposto ao cobre.

Nesse contexto, é necessário ter cautela ao indicar uma espécie de peixe como bioindicadora, já que diversos fatores relacionados à qualidade de água e ao estado nutricional devem ser levados em consideração na avaliação da toxicidade de um contaminante (Sprague, 1990) e, somente a partir daí, inferir se uma espécie é mais sensível que outra.

4.2. Determinação da Ucrit

Exposição de peixes a poluentes pode causar redução no desempenho natatório do animal, pois acarreta distúrbios no transporte de oxigênio e diminui a capacidade de carreamento do oxigênio no sangue (Beaumont *et al.*, 2000). Estudos laboratoriais, usando *Salmo trutta* como modelo, tem avaliado o desempenho natatório após exposição ao cobre e tem verificado que este é responsável pela diminuição da taxa natatória (Beaumont *et al.*, 1995ab). Além disso, a Ucrit tem apresentado reduções de 35% quando os peixes são expostos a concentração de cobre por 96 horas (Waiwood & Beamish, 1978).

No presente trabalho, a velocidade crítica de natação apresentou uma redução significativa em todas as exposições às concentrações subletais de cobre com e sem adição de COD, incluindo o grupo controle com COD. O mesmo foi observado no trabalho de Beaumont *et al.* (2000), onde a espécie *Salmo trutta* foi submetida a exposição ao cobre em diferentes concentrações (0,08 – 0,47µmol/L), em pH 5, evidenciando que a transferência de oxigênio nas brânquias é um fator limitante (Beaumont *et al.*, 1995a). Essa redução da capacidade natatória pode ser explicada pela diminuição da capacidade do peixe

de carrear oxigênio para os músculos locomotores devido ao aumento da viscosidade sanguínea (Beaumont, 1995ab). As mudanças na viscosidade deve ter afetado o exercício, pois houve uma redução do impulso do volume sanguíneo, e isso, por sua vez, provocou um maior esforço do músculo cardíaco (Randall & Brauner, 1991) ou a viscosidade poderia ter afetado a circulação local do sangue nos capilares periféricos (Wells & Weber, 1991).

Os dados hematológicos deste trabalho suportam a hipótese de que o aumento da viscosidade sanguínea causou hipoxia do tecido e, com isso, uma redução da velocidade crítica de natação. Vale ainda salientar, que mesmo não tendo sofrido a ação tóxica do cobre, os indivíduos do grupo controle com adição de COD apresentaram redução da Ucrit. Há, portanto, a necessidade de mais estudos para explicar tais resultados.

4.3 Parâmetros hematológicos

A exposição de peixes a condições estressantes resulta numa série de ajustes por meio de mecanismos homeostáticos (Val, 1995) e este estresse é refletido nos valores de um ou mais parâmetros hematológicos (Van Vuren, 1986). O estresse ácido é responsável por uma grande variedade de respostas hematológicas em peixes de água doce (McDonald *et al.*, 1980), bem como a exposição ao cobre (Nussey *et al.*, 1995; Heath, 1995). Dessa forma, há a necessidade do uso de testes hematológicos para identificar os distúrbios fisiológicos e metabólicos, pois o sangue reflete os processos vitais dos animais em função das variações internas ou ambientais (Nussey *et al.*, 1995).

O decréscimo do pH da água causa uma acidose sangüínea, em razão do aumento da pressão arterial de CO₂. Esta acidose primeiramente diminui o

oxigênio contido no sangue e, associado a um acréscimo nos níveis de catecolaminas circulantes, pode causar um rápido aumento na taxa de ventilação branquial dos peixes. A elevação da Hb, como também do RBC, pode ser uma forma de compensar alguma deficiência que ocorra no processo de trocas gasosas no epitélio branquial, graças a uma situação de acidose respiratória. A elevação da concentração de hemoglobina de *C. macropomum* observada durante a exposição ácida deste estudo, sugere um caminho para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos.

O espessamento do epitélio branquial dificulta as trocas gasosas predispondo o indivíduo a hipoxia. Como consequência, os parâmetros sanguíneos são alterados de forma a desenvolver um melhor transporte de oxigênio no sangue e sua liberação nos tecidos (Heath, 1995). O cobre pode causar hemoconcentração massiva em peixes, ou seja, aumento no valor de hematócrito, na concentração de hemoglobina e no número de eritrócitos (Heath, 1995), como foi observado neste trabalho, onde os indivíduos expostos às concentrações subletais de cobre apresentaram estas alterações. Nussey *et al.* (1995), ao exporem a espécie *O. mossambicus* a 0,16mg/L de cobre e Cerqueira & Fernandes (2002), ao submeterem a espécie *P. scrofa* a 29µgCu/L, também observaram aumento nestes parâmetros, o que pode indicar uma resposta compensatória da espécie para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue.

Os níveis de hematócrito e de concentração de hemoglobina aumentaram nos indivíduos submetidos ao estresse natatório. O primeiro parâmetro aumentou devido à necessidade do peixe ter que manter suas funções fisiológicas estáveis provocadas pelas alterações ambientais. O peixe quando exposto ao estresse

natatório precisou adaptar seus mecanismos físico-químicos para suportar esta adversidade, levando-o a aumentar seus valores de hematócrito. A concentração de hemoglobina no sangue variou de acordo com estas alterações, e possivelmente outras mudanças físico-químicas tenham ocorrido nos eritrócitos que podem ter alterado as propriedades de transportar O₂ (Randall & Bruner, 1991).

Os aumentos e reduções nos parâmetros hematológicos em resposta ao agente estressor podem ocorrer devido à perda ou ganho de água. Assim, a disfunção osmorregulatória pode causar anemia aparente ou, em oposição, policitemia (Heath, 1995). Uma diminuição nos níveis de VCM indica que houve aumento de eritrócitos imaturos que tenham sido liberados dos tecidos eritropoiéticos (Larsson *et al.*, 1985). O volume corpuscular médio (VCM) indica o tamanho das células vermelhas do sangue (Larsson *et al.*, 1985). O tratamento onde os exemplares de tambaqui foram expostos ao cobre apresentou tendência de aumento quanto aos valores de VCM. Um aumento nos níveis deste parâmetro indica que os eritrócitos sofreram turgescência devido ao estresse osmótico (Nussey *et al.*, 1995).

No presente trabalho foi observado aumento nos níveis de hemoglobina corpuscular média (HCM) em indivíduos do grupo controle com adição de COD, incluindo indivíduos submetidos ao estresse natatório; e um aumento significativo na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em todos os tratamentos em relação ao controle e nos indivíduos do grupo controle em pH 7 submetidos ao estresse natatório. O aumento em tais parâmetros indica que a concentração de hemoglobina nas células vermelhas do sangue sofreu um intenso aumento (Wepener *et al.*, 1992 ab). A CHCM é a taxa de concentração

de hemoglobina em relação ao hematócrito e não está influenciada pelo volume do sangue ou pelo número de células vermelhas no sangue. No entanto, este parâmetro pode ser interpretado de maneira incorreta, quando há, por exemplo, a liberação na corrente sanguínea de células vermelhas imaturas com uma diferente concentração de hemoglobina (Soivio e Nikimaa, 1981).

Com relação aos níveis de metahemoglobina, não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos em relação ao controle, nem entre os indivíduos submetidos e os que não foram submetidos ao estresse natatório. Isso sugere que a exposição do tambaqui às concentrações subletais de cobre e ao túnel de natação não induziram à oxidação da hemoglobina para a formação de metahemoglobina que é a forma inativa da hemoglobina, incapaz de se combinar reversivamente ao oxigênio (Schimdt-Nielsen, 1996)

4.4 Parâmetros iônicos

A osmorregulação pode ser considerada o processo pelo qual a pressão osmótica dos fluidos do corpo e o volume de água em um organismo são mantidos relativamente constantes. Peixes de água doce apresentam excesso de água que foi adquirida da osmose e que deve ser eliminada. Tal processo é feito pela produção de urina diluída. Para a perda de sal por difusão pelas brânquias e pele e uma menor parte pela urina, é necessário transportar os sais da água para o sangue, provável função das células ricas em mitocôndrias nas brânquias utilizando energia do ATP e catalisada pela enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$. Mudanças na osmorregulação em peixes expostos a agentes estressantes podem ser elucidadas por estimativa dos eletrólitos do plasma sanguíneo e/ou por meio da osmolalidade total (Heath, 1995).

Os exemplares expostos 25% da CL_{50} de $Cu^{+2}+COD$, bem como os indivíduos submetidos ao túnel de natação do grupo controle em pH 7 e do grupo com 50% da CL_{50} de Cu^{+2} apresentaram aumento significativo nos níveis de potássio plasmático. Este aumento pode ser resultado do efluxo de potássio vindo dos compartimentos intracelulares (Wilson & Taylor, 1993). Segundo Heath (1995) a $Na^+,K^+-ATPase$ das membranas celulares é responsável pela concentração diferencial de potássio entre os fluidos corporais e o citosol. O cobre pode inibir esta enzima em diversos tecidos do corpo, o que pode causar o aumento da concentração de potássio quando o peixe está exposto ao agente tóxico. Este autor afirma que o cobre também pode agir diretamente nas membranas celulares inibindo a $Na^+,K^+-ATPase$, responsável pela bomba de sódio e potássio. Tal fato pode permitir que uma quantidade de potássio nas células difunda-se passivamente para o sangue.

Nos níveis de cálcio plasmáticos foi observado aumento nos indivíduos expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} . Este aumento é dado pelo deslocamento do cálcio das áreas branquiais por cátions divalentes tais como o cobre (Eddy, 1981).

Os níveis de sódio não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, apenas uma tendência de diminuição, sobretudo para os animais expostos a 50% da CL_{50} de Cu^{+2} . O mesmo aconteceu no trabalho de Nussey *et al.*, (1995) ao exporem por 96 horas a espécie *O. mossambicus* a 0,16 mg/L de Cu^{+2} .

Os níveis de cloreto plasmático aumentaram significativamente nos indivíduos submetidos ao estresse natatório do grupo contendo 25% de CL_{50} de $Cu^{+2}+COD$. A baixa concentração de O_2 no sangue, evidenciado com o aumento dos parâmetros hematológicos a fim de aumentar a capacidade de carreamento

do oxigênio, provocou o aumento na concentração de cloreto no plasma a fim de eliminar rapidamente o CO_2 do sangue. Este gás é convertido a HCO_3^- (forma em que é transportado dentro do eritrócito) e então ocorre a liberação do Cl^- para a entrada de HCO_3^- no eritrócito (Gilmour, 1998). O custo energético da homeostase iônica é um fator importante a ser considerado, pois pode comprometer outros processos metabólicos dependentes de energia, como o crescimento, se tornando um entrave ao desenvolvimento natural destes vertebrados.

4.5 Avaliação de estresse

Uma das principais fontes de energia utilizadas pelos peixes é o carboidrato, que estocado no fígado como glicogênio, depende da demanda energética para ser degradado e transportado à musculatura por meio do sangue na forma de glicose (Soengas & Moon, 1995). Muitos peixes quando submetidos a situações de estresse realizam ajustes metabólicos que incluem a redução do metabolismo basal e a utilização de processos como a glicogenólise, que converte o glicogênio armazenado no fígado em glicose (Hochacka & Somero, 1984). Um aumento na concentração de glicose no plasma indica que o metabolismo de carboidrato está ativado. As mudanças que ocorreram na glicose devem refletir um aumento na demanda energética para manter a homeostase (Takasusuki, *et al.*, 2004).

Os níveis de glicose apresentaram-se elevados em todas as concentrações de cobre, incluindo aquelas com adição de COD e em todos os indivíduos submetidos ao estresse natatório. Este resultado é devido à condição em que os peixes foram submetidos, já que, o nível de glicose sanguíneo é freqüentemente citado como um indicador fisiológico sensível para o estresse em peixe (Wedermeyer & McLeay, 1981). Pelgrom *et al.* (1995) analisaram os efeitos

do cobre sobre a tilápia *Oreochromis mossambicus* e verificaram que houve aumento da concentração de glicose no plasma (hiperglicemia) de peixes expostos a altas concentrações deste metal.

De acordo com Alkindi *et al.* (1996), a hiperglicemia é uma resposta comum ao estresse em peixes de água doce e é considerada um indicador de poluição ambiental. Os aumentos observados nos níveis de glicose dos indivíduos expostos ao pH 4 e ao cobre, além daqueles submetidos ao estresse natatório podem ocorrer devido ao estresse causado por mudanças nas características ambientais (Santos & Pacheco, 1996). Segundo Mazon (1997), esses aumentos podem ocorrer de forma mais severa, por alterações histopatológicas branquiais que podem interferir na respiração dos animais provocando uma hipoxia interna, que por sua vez, pode estimular o metabolismo anaeróbico.

Em situações estressantes, como ambientes com concentração de oxigênio reduzida, determinados peixes podem produzir lactato (Hochachka & Somero, 1984). As concentrações de lactato plasmático, diferente do observado para os níveis de glicose, não apresentaram aumento em nenhum dos tratamentos, mas somente nos indivíduos submetidos ao estresse natatório. Esta situação indica que o estresse causado pela exposição a este metal não foi suficiente para ativar o metabolismo anaeróbico. Esse resultado condiz com os observados para os parâmetros hematológicos desses indivíduos que sofreram fadiga (presente estudo). No caso dos demais indivíduos submetidos às concentrações subletais de cobre, foi evidente que o exercício excessivo foi capaz de ativar o metabolismo glicolítico anaeróbico. A exposição ao cobre não promoveu alterações nas concentrações de lactato plasmático de indivíduos de *Ictalurus punctatus* (Griffin *et al.*, 1999) e *Oncorhynchus mykiss* (Dethloff *et al.*, 1999) e na espécie *Salmo*

trutta, submetida a exposição ao cobre (0,08 – 0,47 μ mol/L), e ao pH 5 (Beaumont *et al.*, 2000).

4.6 Avaliação de efeitos genotóxicos (Anormalidades nucleares eritrocitárias)

Os peixes são excelentes organismos para se estudar o potencial mutagênico e/ou carcinogênico de poluentes aquáticos (Al-Sabti, 1991; Farah *et al.*, 2003). Peixes expostos a determinados metais podem apresentar micronúcleos e outras anormalidades nos núcleos dos eritrócitos (ANE) (Sanchez-Gallan *et al.*, 1999; 2001). Porém, os animais podem produzir anormalidades nucleares naturalmente, por um erro no processo de divisão celular (Heddle *et al.*, 1991).

Os micronúcleos surgem de fragmentos de cromossomos que não são incorporados no núcleo da célula depois da mitose (Heddle *et al.*, 1991). No entanto, Ayllón & Garcia-Vazquez (2001) afirmam que os mecanismos de formação das anormalidades nucleares não são completamente conhecidos.

Micronúcleos e anormalidades nucleares têm sido utilizados como biomarcadores e ou indicadores genotóxicos de contaminação em animais expostos a substâncias químicas que possuem capacidade genotóxica (Pacheco & Santos, 1998; Sanches-Gallan *et al.*, 1999, 2001; Ayllón & Garcia-Vazquez, 2001). A principal aplicação desse modelo é a determinação da distribuição e do efeito químico do contaminante no ambiente aquático (Matsumoto & Cólus, 2000). A genotoxicidade do cobre foi evidenciada pelo aumento observado na frequência de ANE nos exemplares de *C. macropomum* expostos às concentrações subletais de cobre. Esses resultados concordam com os observados por Oliveira (2003) que expôs essa mesma espécie a 0,365mg/L de Cu⁺² por 96 horas em pH neutro.

4.7 Análises enzimáticas antioxidantes

A exposição de peixes a metais induz estresse oxidativo por meio da formação de espécies reativas e peroxidação lipídica. Para se proteger contra o estresse oxidativo, os organismos possuem defesas antioxidantes, por exemplo, as enzimas CAT e GST. Em situações de estresse, o sistema de detoxificação é ativado para agir contra as modificações químicas e são essenciais para a sobrevivência dos organismos (Picada *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a espécie *C. macropomum* não apresentou diferenças na atividade das enzimas GST e CAT quando exposta às concentrações subletais de cobre e com adição de COD. No trabalho de Dautremepuits *et al.* (2002) a espécie *Cyprinus carpio* foi exposta a 100 e 250µg de Cu/L na forma de CuSO₄, e as atividades de GST apresentaram aumento. Já no trabalho de Sanchez *et al.* (2005), a espécie *Gasterosteus aculeatus* apresentou aumento nas atividades de CAT após ser exposta a 200 µg de Cu/L por 21 dias. Segundo Van der Oost *et al.* (2003), a atividade da GST é um parâmetro complexo devido ao fato desta enzima poder tanto ser ativada quanto inibida na presença de certos tipos de contaminantes. A atividade da catalase (CAT) pode ser ativada ou inibida sob estresse químico (Cossu *et al.*, 2000), por exemplo, tanto uma resposta quanto outra irá depender da intensidade e da duração do estresse aplicado ao organismo, assim como da susceptibilidade deste organismo ao agente estressor. A ativação pode ser considerada como uma adaptação do organismo a fim de enfrentar um estresse ambiental prevenindo assim a toxicidade. A inibição poderia estar indicando uma maior susceptibilidade a contaminação química podendo ser esperado efeitos adversos neste caso.

Neste trabalho houve a necessidade de investigar o efeito do cobre na defesa antioxidante de *C. macropomum* incluindo a susceptibilidade à peroxidação lipídica. A espécie não parece ser sensível ao modelo para estudar o estresse oxidativo induzido pelo cobre.

4.8 Determinação do acúmulo do metal nos tecidos

A bioconcentração, processo de acumulação de um composto presente na água, pelos peixes ou outros organismos aquáticos tem grande importância nas avaliações da contaminação ambiental, principalmente em peixes, devido a esses organismos serem excelente fonte protéica para os seres humanos (Mazon, 1997). A maioria dos metais é absorvida na forma iônica, podendo alcançar os tecidos por meio das brânquias e alimentação e pela tomada de água, no caso dos peixes marinhos. Já no interior dos organismos, estes elementos-traço são transportados pelo sangue ligados a proteínas, podendo ser acumulados dentre outros órgãos, nas brânquias, no rim e, em especial, no fígado (Heath, 1995). Em baixo pH o aumento no acúmulo de cobre nos tecidos de peixes pode ser devido ao fato de que baixo pH aumenta a solubilidade do cobre e a perda da capacidade do muco se ligar ao metal (Graney *et al.*, 1984).

No presente trabalho, uma pequena parte do cobre presente na água foi absorvida pelos peixes, isso foi comprovado pela bioconcentração dos metais nos tecidos dos animais. Foi observada bioconcentração de Cu^{+2} nas brânquias e no fígado, em ordem decrescente, respectivamente, de exemplares de *C. macropomum* expostos às concentrações subletais de cobre e com adição de COD. Para os três tecidos analisados, as maiores concentrações de cobre foram observadas no fígado e nas brânquias. O elevado acúmulo de cobre encontrado no fígado pode ter ocorrido porque é no fígado que ocorre a maioria das reações

bioquímicas, incluindo o metabolismo dos metais (Linde *et al.*, 1999), conhecida como processo de detoxificação (Heath, 1995). O elevado acúmulo de cobre encontrado nas brânquias pode ter ocorrido devido a complexação do íon cobre com o muco sobre a superfície lamelar (Wong *et al.*, 1999). Os menores valores de cobre foram detectados nos rins. Isso ocorre porque a bioconcentração do cobre depende da concentração e do tempo de exposição (Marr *et al.*, 1996). Estudos de Hossain & Shariff (1995) sobre a bioacumulação de cobre em *Carassius auratus* mostrou que o cobre se acumula em diferentes tecidos tais como rins, fígado, baço e músculo e estas taxas variam, dependendo do tempo de exposição e da concentração.

5. CONCLUSÕES

1. A toxicidade do cobre apresentou-se menor em pH 4 em comparação ao pH neutro e não houve efeito letal para os indivíduos expostos ao cobre em pH 8, não sendo possível determinar sua CL_{50} .
2. O valor encontrado para a CL_{50} de cobre em pH 4 para a espécie *C. macropomum* foi de 2,68mg/L de Cu^{+2} , valor maior que os valores de CL_{50} de outras espécies encontrados na literatura.
3. A velocidade crítica de natação (U_{crit}) apresentou-se reduzida em todas as concentrações subletais de cobre, o que indica um efeito negativo deste metal; no entanto, a U_{crit} também apresentou-se reduzida no grupo controle com adição de COD, sugerindo que outros fatores, que não o cobre, possam ter causado tal efeito implicando na necessidade de mais estudos.
4. A exposição de *C. macropomum* à concentração subletal de cobre causa distúrbios nos parâmetros respiratórios em *C. macropomum*.
5. As alterações nas concentrações dos íons plasmáticos K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Cl^- de *C. macropomum* evidenciam que a exposição ao cobre por 96 horas afeta a regulação iônica.

6. O aumento na concentração de glicose nos indivíduos expostos ao cobre, além daqueles submetidos ao exercício no túnel de natação, comprova o estresse. No entanto, os níveis de lactato plasmático foram afetados apenas nos indivíduos que sofreram estresse natatório.
7. Apesar das altas concentrações de cobre utilizadas para este experimento, não foram suficiente para causar alterações nos mecanismos de defesa antioxidante do organismo de *C. macropomum*.
8. Foi evidente que a exposição às concentrações subletais de cobre e com adição de COD foram capazes de causar efeitos genotóxicos em *C. macropomum*.
9. Os resultados deste estudo provêm evidências que a acumulação do cobre está relacionada à toxicidade do cobre e que o pH da água é um fator determinante neste processo.
10. A bioconcentração de cobre foi evidenciada nas brânquias e fígado de *C. macropomum*, sendo o fígado o que apresentou maior acúmulo.
11. A utilização de carbono orgânico dissolvido neste experimento, não apresentou efeito atenuante na toxicidade do cobre.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method. Enzym.*, 105: 121-126.
- Alkindi, A.Y.A.; Brown, J.A.; Waring, C.P.; Collins, J. E. 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.*, 49: 1291-1305.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. 1995. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. *In: Val, A.L.; Honczarynk, A. (Eds). Criando Peixes na Amazônia.* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 45-59.
- Al-Sabti, K. 1991. *Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosome*. ISBN 86 80023-17-5. pp. 230 . Jozef Stefan Institute, Jamova 39, 61111 Ljubljana, Slovenia.
- APECO, 1993. *Evolución ambiental de actividades petroleras; Lago Titica, Puno.* Programa de asesoria ambiental para la Región Andina. Lima, mayo. 23p.
- Araújo-Lima, C.A.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia.* Sociedade Civil de Mamirauá. Brasília-CNPq, Tefé, Amazonas. 186p.
- Aride, P.H.R. 1998. *Efeito do pH da água nos parâmetros hematológicos e ganho de peso de Colossoma macropomum (Cuvier, 1818).* Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisa do Amazonas/Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 52p.
- ATSDR, 1990. *Toxicological profile for copper.* Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Ayllón, F.; Garcia-Vazquez, E. 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49: 221-225.
- Beaumont, M.W.; Butler, P.J.; Taylor, E.W. 1995a. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft, acidic water, its effect upon sustained swimming performance. *Aquat. Toxicol.*, 33:45-63.
- Beaumont, M.W.; Butler, P.J.; Taylor, E.W., 1995b. Plasma ammonia concentration in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to sub-lethal copper in soft, acidic water and its relationship to decreased swimming performance. *J. Exp. Biol.*, 198: 2213-2220.
- Beaumont, M.W.; Butler, P.J.; Taylor, E.W. 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water:

- effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquat. Toxicol.*, 51: 259-272.
- Benesch, R.E.; Benesch, R.; Yung, S. 1973. Equation for the spectrophometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analit. Biochem.*, 55: 215-218.
- Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 21: 1183–1226
- Brow, B.A. 1976. *Hematology principles and producers*. 2ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Brune, A.; Dietz, K.J. 1995. A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grows in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel, and zinc concentrations. *J. Plant Nut.*, 18(4): 853-868.
- Carrasco, K.R.; Tilbury, K.L.; Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47: 2123-2136.
- Carvalho, C.S.; Araújo, H.S.S.; Fernandes, M.N. 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparat. Biochem. Physiol. Part B*, 137: 225-234.
- Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52: 83-91.
- Cossu, C.; Dayotte, A.; Babut, M.; Ger, A.; Vasseur, P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves *Union tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox. Environ. Saf.*, 45: 106-121.
- Costa, O.T.F.; Pedraça, E.B.; Val, A.L. 1996. Efeito do petróleo sobre o consumo de oxigênio tissular e níveis de eletrólitos plasmáticos de *Colossoma macropomum* (Caraciformes, Serrassalmidae). *Rev. UA Ciên. Biol.*, 1(1): 85-95.
- Cusimano, R.F.; Brakke, D.F.; Chapman, G.A. 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 1497-1503.
- Damato, M. 1997. *Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinarias de petróleo na sua toxicidade, empregando diferentes espécies indicadoras*. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, p. 335.
- Dautremepuits, D.E.; Betoulle, S.; Vernet, G. 2002. Antioxidant response modulate by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta* (1573): 4-8.

- Dethloff, G.M.; Schlenk, D.; Hamm, J.T.; Bailey, H.C. 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 42: 253-264.
- Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S., Paquin, P.R.; Santore, R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 220: 2383-2396.
- Eddy, F.B. 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. *In: Stress and Fish* (Edited by Pichering A. D.), Academic Press, London. pp. 77-102.
- Farah, M.A.; Ateeq, B.; Niamat, M.A.; Ahmad, W. 2003. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Chana punctatus*. 54: 25-29.
- Géry, J. 1977. *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. Characoids World: 1-672.
- Gilmour, K.M. 1998. Gas exchange. *In: Evans, D.H. (Ed). The physiology of fishes*. CRC Press LLC. p. 101-127.
- Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest. Exploitations in Amazon Natural History*. University of California Press, Los Angeles. 280p.
- Graney, R.L.; Cherry, D.S.; Cairns, J. 1984. The influence of substrate pH and temperature upon cadmium accumulation in the asistec clam (*Corbicula fluminea*) in laboratory artificial streams. *Wat. Res.* 18: 833-842.
- Griffin, B.R.; Davis, K.B.; Schlenk, D. 1999. Effect of simulated copper sulfate therapy on stress indicators in channel catfish. *J. Aquat. Animal Health*, 11 (3): 231-236.
- Grosell, M.; Wood, C.M. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.*, 205: 1179-1188.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biolog. Chemist.*, 249: 7130-7139.
- Habig, W. H.; Jakoby, W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth.Enzymol.*, 77: 398-405.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Envirom. Sci. Tech.*, 11(7): 714-719.

- Han, F.X.; Hargreaves, J.A.; Kingery, W.L.; Huggett, D.B.; Schlent, D.K. 2001. Accumulation, distribution and toxicity of copper in sediments of catfish ponds receiving periodic copper sulfate applications. *J. Environ. Qual.*, 30: 912-919.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, FL. 245p.
- Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, P; MacGregor, J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.
- Hering, G.; Morel, F.M.M. 1988. Kinetics of trace metal complexation: role of alkali earth metals. *Environ. Sci. Technol.*, 19: 187-192.
- Hochachka, P.W.; Somero, G. N. 1984. *Biochemical adaptations*. Princeton University Press, Princeton. 537p.
- Hodson, P.V.; Borgmann, U.; Shear, H. 1979. Toxicity of copper to aquatic biota. In: Nriagu, J. O. (Ed.), *Copper in the Environment, Part II – Health Effects*. John Wiley & Sons, Toronto, Ontario, Canada.
- Hollis, L.; Muench, L.; Playle, R.C. 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium binding, by gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 50: 703-720.
- Holt, M.S. 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.*, 38: 21-27.
- Hossain, M.A.; Shariff, M. 1995. Changes in the haematological parameters of gold fish *Carassius auratus* Linnaeus exposed to sublethal copper. *Journal of Asiatic Society of Bangladesh, Science*, 21: 263-270.
- Howarth, R.S.; Sprague, J.B. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Wat. Res.*, 12: 455-462.
- Jardim, W.F. 1992. A contaminação dos recursos hídrico por esgotos domésticos e industriais. *Química Nova*, 15: 2.
- Jordão, C.P.; Pereira, J.L.; Jham, G.N. 1997. Chromium contamination in sediment, vegetation and fish caused by tanneries in the State of Minas Gerais, Brazil. *Sci. Total Environ.*, 207(1): 1-11.
- Kampen, E.J.; Zijlstra, W.G. 1964. Standardization of haemoglobinometry. In: Boroviczeny, C. G. (Ed.). *Erythrocytometric Methods and their standardization*. *Bibl. Haematol.*, 18: 68-72.

- Karan, V.; Vitorovic, S.; Tutundzic, V.; Poleksic, V. 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40: 49-55.
- Klerks, P. L.; Fraleigh, P.C. 1997. Uptake of nickel and zinc by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 32(2): 191-197.
- Larsson, A.; Aux., C; Sjobeck, M. 1985. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9: 250-281.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol. B*, 155: 635-644.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1986. Influence of water hardness pH and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson modulation by water hardness and pH. *Can. J. Fish. Aquat. Scienc.*, 43: 1488-1496.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Scien.*, 44: 99-104.
- Li, J.; Lock, R.A.C.; Klaren, P.H.M.; Swarts, H.G.P.; Schuurmans Stekhoven, F.M.A.H.; Wendelaar Bonga, S.E.; Flik, G. 1996. Kinetics of Cu⁺⁺ inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. *Toxicol. Lett.*, 87: 31-38.
- Li, J.; Quabius, E.S.; Wenderlaar Bonga, S.E.; Flik, G.; Lock, R.A.C. 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.*, 43: 1-11.
- Lichtenfels, A.J.F.C.; Lorenzi-Filho, G. Guimarães, E.T.; Macchione, M.; Saldiva, P.H.N. 1996. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. *J. Comp. Path.*, 115: 47-60.
- Linde, A.R.; Sanchez-Gallan, S.; Klein, D.; Garcia-Vasquez, E.; Summer, F. 1999. Metallothionein and heavy metal in brown trout (*Salmo trutta*) and european eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44: 168-173.
- Lloyd, R. 1992. *Pollution and freshwater fish*. The Buckland Foundation, Oxford. 176p.
- McDonald, D.G.; Höbe, H.; Wood, C.M. 1980. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *J. Exp. Biol.*, 88: 1090-131

- MacDonald, D.G. 1983. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. *Can. J. Zool.*, 61: 739-703.
- McDonald, D. G.; Wood, C. M., 1993, Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. *In: J. C. Rankin & F. B. Jensen (eds.), Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London.
- Maco Garcia, J.T. 1997. *Influência da água de formação da extração de petróleo do rio Urucu sobre aspectos hematológicos e conteúdo iônico de Colossoma macropomum e Glyptoperichthys joselimaianus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 90p.
- Marr, J.C.A.; Lipton, J.; Cacela, D. Hansen, J.A.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Hogstrand, C. 1996. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquat. Toxicol.*, 36: 17-30.
- Marr, J.C.A.; Hansen, J. A.; Meyer, J. S.; Cacela, D.; Podrabsky, T.; Lipton, J.; Bergman, H. L. 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of mechanistic model for predicting survival. *Aquat. Toxicol.*, 43: 225-238.
- Matsuo, A.Y.O.; Oliveira, N.G.F.; Val, A.L., 2001. Efeito do cálcio e de substâncias húmicas na biodisponibilidade de zinco em tambaqui: balanço iônico, hematologia e alterações enzimáticas. 7^a. *Reunião Especial da SBPC*. Manaus, AM.
- Matsuo, A.Y.O.; Val, A.L. 2003. Aluminum effects in *Colossoma macropomum* exposed to softwater, calcium, and humic substances at low pH: implications for local aquaculture. *Annual Meeting of the World Aquaculture Society*, Salvador, BA.
- Matsuo, A.Y.O. 2004. *Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do rio Negro, Amazônia, com ênfase na regulação iônica*. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 204p.
- Matsumoto, F.E.; Cólus, I.M.S. 2000. Micronucleus frequencies in *Astynax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamine or vinblastine sulfate. *Genet. Mol. Biol.*, 23(2): 489-492.
- Mazon, A.F. 1997. *Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, Prochilodus scrofa (Steindachner, 1881)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 160p.
- Mazon, A.F.; Cerqueira, C.C.C.; Monteiro, E.A.S.; Fernandes, M.N. 1999. Acute copper exposure in freshwater: morphological and physiological effects. *In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M. (Eds). Biology of tropical fishes*. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. p. 263-275.

- Mazon, A.F.; Fernandes, M.N. 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 63(6): 797-804.
- Mazon, A. F.; Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res. Sect. A*, 88: 52-63.
- Menezes, A.C.L. 2002. *Avaliação do efeito de dois metais pesados presentes na água de formação, derivada da extração de petróleo da província do Urucu, sobre o tambaqui (Colossoma macropomum)*. Monografia. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 39p.
- Menezes, J. 1998. A componente sanitária da piscicultura. Manual de aquacultura. Henriques, M.A.R. Aquamarim.
- Milligan, C.L.; Wood, C.M. 1982. Disturbances in haematology, fluid volume distribution, and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.*, 126: 277-286.
- Moura, M.A.F.; Farias, I.P.; Val, A.L. 1994. Effects of temperature on leukocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, (27): 1589-1598.
- Moura, M.A.F.; Oliveira, M.I.S.; Val, A.L. 1997. Effects of hypoxia on leukocytes of two amazon fish *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. *Rev. UA. Série: Ciênc. Biol.*, 1(2): 13-22.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2000. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 3rd Ed. Worth Publishers. New York. 1152p.
- Nussey, G.; Van Vuren, J.H.J.; Du Preez, H.H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichilidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 111 (3): 369-380.
- Oliveira, C. P. F.; Chagas, E. C.; Val, A. L., 2001. Efeito do cobre sobre o tamoatá, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828): respostas enzimáticas e níveis de estresse durante a exposição à concentração subletal. 7^a. *Reunião Especial da SBPC*. Manaus, AM.
- Oliveira, C.P.F. 2003. *Efeito do cobre e do chumbo presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui Colossoma macropomum (Curvier, 1818)*. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 70p.

- Pacheco, M.; Santos, M.A. 1998. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40:71-76.
- Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 342-347.
- Paquin, P.R.; Di Toro, D.M.; Santore, R.C.; Triveldi, D.; Wu, K. 1999. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. III. Application to fish and daphnia exposure to fish. In: *Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments*. EPA-822-E99-001. Office of Water, Office of Research and Development, Washington, DC, p. 3-59-3-102.
- Pelgrom, S.M.G.J.; Lock, R.A.C.; Balm, P.H.M.; Wendelaar-Bonga, S.E. 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.*, 32: 303-320.
- Picada, J.N.; Kern, A.L.; Ramos, A.L.L.P.; Saffi, J. 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: *Genética Toxicológica*. J. Silva; B. Erdtmann & J.A.P. Henriques. (Eds.) Porto Alegre: Alcance. pp. 251-268.
- Playle, R.C.; Gensemer, R.W.; Dixon, D.G. 1992. Copper accumulation on gills of fished minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 381-391.
- Playle, R.C.; Dixon, D.G.; Burnison, K. 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modeling of metal accumulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2678-2687.
- Randall, D.J.; Brauner, C. 1991. Effects of environmental factors on exercise in fish. *J. Exp. Biol.*, 160: 113-126.
- Roméo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.*, 48: 185-194.
- Saint-Paul, U. 1988. Diurnal routine O₂ consumption at different O₂ concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (Teleostei: Serrassalmidae). *Com. Biochem. Physiol.*, 89(4): 675-682.
- Sampaio, A. Q. 2000. *Caracterização física e química dos sedimentos na área do Distrito Industrial de Manaus (AM)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, Universidade do Amazonas, Manaus, 81p.
- Sanches-Gallan, S.; Linde, A.R.; Izquierdo, J.I.; Garcia-Vazquez, E. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*):

- complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mut. Res.*, 412: 219-225.
- Sanches-Gallan, S.; Linde, A.R.; Garcia-Vazquez, E. 1999. Brown trout and european minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, 43: 301-304.
- Sanches-Gallan, S.; Linde, A.R.; Ayllon, F.; Garcia-Vazquez, E. 2001. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49: 139-143.
- Sanchez, W.; Palleul, O.; Meunier, L.; Coquery, M.; Porcher, J.; Ait-Aïssa, S. 2005. Copper-induced oxidative stress in three spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19: 177-183.
- Santore, R.C.; Di Toro, D.M.; Paquin, P.R.; Allen, H.E.; Meyer, J.S. 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 2397-2402.
- Santos, M.A.; Pacheco, M. 1996. *Anguilla anguilla* L. stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 35: 96-100.
- Schlottfeldt, H.J. 1992. Current practices of chemotherapy in fish culture. In: Michel, C., Alderman, D.J. (Eds.), *Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality*. OIE, Paris, pp. 25-33.
- Schmidt-Nielsen, K. 1996. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. 5ª edição. Ed. Santos, São Paulo. pp. 151-168.
- Seymore, T.; Du Preez, H.H.; Van Vuren, J.H.J. 1996. Bioaccumulation of chromium and nickel in the tissues of *Barbus marequensis* from the Lower Olifants River, Mpumalanga. *South Afric. J. Zool.*, 31(3): 101 –109.
- Soengas, J.; Moon, T. Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel *Anguilla rostrata*. *J. Biol.*, 198: 877-888.
- Soivio, A; Nikimaa, M. 1981. Changes in haematocrit values in blood samples treated with and without oxygen. A comparative study with four salmonid oxygen. A comparative study with four salmonid species. *J. Fish. Biol.*, 6: 763-769.
- Sorensen, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. Boca Raton, CRC, 374p.

- Sprague, J.B. 1990. Aquatic Toxicology. *In*: Schrech, C.B.; Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. p. 491-528.
- Takasusuki, J.; Araújo, M.R.R.; Fernandes, M.N. 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72: 1075-1082.
- Tao, S.; Liang, T.; Cao, J.; Dawson, R.W.; Liu, C. 1999. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44: 190-195.
- Tao, S.; Li, H.; Liu, C. & Lam, K.C. 2000a. Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46: 174-180.
- Tao, S.; Long, A.; Liu, C. & Dawson, R. 2000b. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 47: 59-64.
- Tao, S.; Long, A.; Xu, F.; Dawson, W. 2002. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52: 221-226.
- Val, A. L. 1995. Oxygen-transfer in fish-morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Medic. Biol. Res.*, 28: 1119-1127.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment. Physiological and Biochemical Aspects*. Springer-Verlag, Berlin. Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of Tropical Fishes*. Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus. pp. 263-275.
- Val, A.L.; 1997. Efeitos do petróleo sobre a respiração de peixes da Amazônia. *In*: Martos, H.L. & Maia, N.B. (Eds). *Indicadores ambientais*. Pontifícia Universidade Católica. Sorocaba, São Paulo. Sorocaba. p. 109-119.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. *In*: *Biology of Tropical Fishes*. Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. p. 277-291.
- Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. 2000. *Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. 399p.
- Van der Oost, R. Beyerb, J.; Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- Van Vuren, J.H.J. 1986. The effects of toxicants on the haematology of *Labeo umbratus* (Teloestei: Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 93C(1), 155-159.

- Waiwood, K. G.; Beamish, F. W. H. 1978. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming speed of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Water Res.*, 12: 611–619.
- Walker, I. 1995. Amazon streams and small rivers. *In*: Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T.; Bicudo, C.E. (Eds.), *Limnol. Brazil*, p. 176-193.
- Wedemeyer, G.; McLeay, D.J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stress on fish health. *U.S. Tech. Pap. U.S. Fish Wildl. Serv.*, 89: 1-18.
- Wells, R.M.G.; Weber, R.E. 1991. Is there an optimal haematocrit for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? An interpretation of recent data based on blood viscosity measurements. *J. Fish Biol.* 38: 53-65.
- Wepener, V.; Van Vuren, J.H.J; Du Preez, H.H. 1992a. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the haematology of *Tilapia sparmanii* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 101C (2): 375-381.
- Wepener, V.; Van Vuren, J.H.J; Du Preez, H.H. (1992b). Effect of manganese and iron at neutral and acidic pH on the hematology of the banded tilapia (*Tilapia sparrmanii*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 613-619.
- Wilson, R.W.; Taylor, E.W. 1993. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. *J. Comp. Physiol. B*, 163: 38-47.
- Wong, P.P.K, Chu, L.M. & Wong C.K. 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environ. Internat.*, 25(4): 417-422.
- Wood, C.M.; Wilson, R.W.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Bergman, H.L.; Narahara, A.; Val, A.L. 1998. Responses of an amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiol. Zool.*, 71: 658-670.
- Wood, C.M. 2001. Toxic responses of the gill. *In*: Benson, W.H.; Schlenk, C.W., (Eds). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Taylor & Francis, Washington, DC., p. 1-87.
- Xie, L.; Klerks, P.L. 2004. Changes in cadmium accumulation as a mechanism for cadmium resistance in the least killifish *Heterandria Formosa*. *Aquat. Toxicol.*, 66 (1): 73-81.
- Zall, D. M.; Fisher, M.; Garner, M.Q. 1956. Photometric determination of chlorides in water. *Anal. Chemist.* 28: 1665-1668.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. 2ed. Prentice-Hall, New Jersey. 718p.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)