

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

O uso do Modelo do Ligante Biótico (BLM) para avaliação da contaminação por cobre em águas da Amazônia.

ANA HELENA VARELLA BEVILACQUA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

MANAUS-AM
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

O uso do Modelo do Ligante Biótico (BLM) para avaliação da contaminação por cobre em águas da Amazônia.

ANA HELENA VARELLA BEVILACQUA

ORIENTADOR: Adalberto Luis Val, Dr.

Co-orientadora: Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Dra.

Fonte Financiadora: INPA PPI#PRJ-0537; FAPEAM; CNPq; ICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

MANAUS-AM
2009

Dedico
A Aurélia e a Ana Cristina
que, apesar da distância,
estiveram sempre ao meu lado.

B571 Bevilacqua, Ana Helena Varella
O uso do Modelo do Ligante Biótico (BLM) para avaliação da contaminação por cobre em águas da Amazônia / Ana Helena Varella Bevilacqua .--- Manaus: [s.n.], 2009. x, 47 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2009
Orientador : Adalberto Luis Val
Co-orientador : Fabíola Valdez Domingos
Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Rios – Amazônia – Teor de cobre. 2. Cobre – Aspectos ambientais – Amazônia. 3. Ecotoxicologia. 4. Ligante do Modelo Biótico (programas de computador). 5. Peixes – Teor de cobre – Amazônia. I. Título.

CDD 19. ed. 574.526323

Sinopse

Este trabalho avaliou a viabilidade do Modelo do Ligante Biótico (BLM) como ferramenta para a determinação da toxicidade do cobre em diferentes águas da Amazônia. O BLM é um programa computacional criado para prever a toxicidade de metais de transição frente a variações nas características físico-químicas da água em ambientes naturais. Constitui-se em uma ferramenta capaz de prever a redução da toxicidade do cobre com o aumento da concentração natural de matéria orgânica, carbonatos e aumento do pH. Para isso foram realizados testes de toxicidade aguda (CL₅₀-96h) utilizando peixes e água coletados nos rios Solimões, Amazonas e Negro, nas proximidades das cidades de Tefé, Itacoatiara, Santa Isabel do Rio Negro e Barcelos e da Estação Ecológica de Anavilhanas. Com os resultados obtidos é possível afirmar que o programa é capaz de prever a toxicidade do cobre em águas com valores de pH acima de 5. Porém, o modelo necessita de calibração para prever a toxicidade do cobre em águas ácidas, isto é, há a necessidade de estudos mais aprofundados em águas com valores de pH abaixo de 5 para calibrar o modelo para que se possa determinar a parcela de cobre disponível para interagir com os organismos aquáticos causando toxicidade.

Agradecimentos

A Deus, pela vida, pela força para enfrentar novos acontecimentos e possíveis frustrações e por permitir trilhar meu caminho, orientando-me nas difíceis escolhas da vida.

Ao meu orientador, Dr. Adalberto Luis Val, pela orientação, apoio e oportunidades geradas, confiando sempre em meu potencial de crescimento pessoal e profissional.

A Fabíola Xochilt Valdez Domingos, pela co-orientação e apoio.

A Vera Maria F. de Almeida e Val, pela orientação, amizade e pelo conforto gerado em nossas conversas.

A Maria Angélica Laredo por toda a ajuda prática e amizade durante o curso e principalmente durante a finalização da dissertação. Angélica sempre esteve pronta a me ouvir e ajudar a me entender.

A Maria Nazaré Paula da Silva, por toda a ajuda prática, durante as organizações das coletas, solicitações do IBAMA, pedidos e requisições, ora puxando a orelha, ora incentivando meu trabalho, mas sempre pronta a ajudar.

Ao Rafael Duarte, meu veterano de faculdade e de LEEM, pela leitura dos manuscritos, sempre com paciência a me ensinar alguma coisa, apesar de nunca achar que o trabalho estivesse realmente pronto.

As meninas, Daiani Kochhann, Gisele Vilarinho, Manoela Jardim e Vivianne Fonseca, colegas e amigas, quase irmãs, pela ajuda, paciência, incentivo, durante o curso, durante as intermináveis coletas e análises de dados e principalmente pela amizade, sempre me apoiando, por mais errada que eu estivesse.

As companheiras de sala, Christiane Oliveira e Katherine Vasquez, ao antigo companheiro de sala, Marcos Prado, e a toda a equipe do LEEM, Alzira, Carol, Gil, Karen, Luciana, Márcio, Ronildo, Sandra, Vivian, Dona Sonia e Dona Help, pela colaboração, amizade e por tornarem os papos durante o café tão agradáveis. E especialmente ao Ramon, pelas ajudas em campo, companhia e amizade durante estes dois anos.

A Raquel Abecassis, Sylvia Renata, Luiza Pinheiro e Evelyn, pela ajuda logística durante as várias coletas e solicitações de transporte.

Ao Rubens Honda e ao Pedro Caraballo pelas leituras do plano e dicas importantes de coleta.

A Dra. Angela Varella, a Carminha, a Elany, aos professores e a todos do BADPI pela ajuda prática e logística durante os dois anos de curso.

A Sandra Carvalho Rodrigues da Universidade Federal de Rio Grande e a Dra. Hyllandia Brandão do INPA pelas análises de carbono orgânico dissolvido.

Em Tefé, agradeço ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade, ao Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, ao Jonas, ao Maracanã e ao Jefferson, e especialmente ao

Leonard Schun, pela ajuda prática e logística, disponibilização dos flutuantes e na realização dos experimentos e coleta dos peixes.

Em Itacoatiara, agradecimento especial a Dona Ana, ao Silvano e sua família pela disponibilidade do local de “experimento”, por toda a companhia e papos. Ao Seu Márcio pela coleta dos peixes. Ao Chazan e ao Seu Arnaldo por estarem sempre prontos a me ajudar, com disposição e amizade.

Em Barcelos, a Lúcia Goes, ao Raimundo André da Silva, pela ajuda logística e prática durante as coletas e por me apresentarem a Barcelos; a Dona Iracema e família, pela disponibilidade de abrigo para os experimentos, pelos almoços, merendas e papos; aos pescadores e colaboradores, Dona Mara e Eudes, Inã, Seu Alfredinho; ao Thiago, Kikão, Malu, Papilinho, e a toda a galerinha da cidade pela companhia durante as coletas, praças, praias e forrós.

Em Santa Isabel do Rio Negro, a Secretária do Meio Ambiente, ao Edinho e ao Murilo, a Dona Regina, a Jaque e família, pelo auxílio durante as coletas.

No Parque Nacional de Anavilhanas, ao IBAMA, pela disponibilização do flutuante, ao Maque e ao André pela ajuda prática nos experimentos e especialmente ao Bruno Marchena, pela ajuda durante as coletas e por se tornar este amigo que aprecio tanto.

A turma de 2007 do mestrado do BADPI, a famosa Galerinha do BAD, André, Arnold, Carol, Carlos, Denise, Fê, Gio, Igor, Ladis, Luiz, Melina, Paty, Talita, por todos os momentos juntos, desde as aulas de estatística, prévias de qualificações até as festas e almoços.

Ao Mateus Paciência e ao Wilson Malavazi e a toda a equipe do *Escola da Natureza* pela possibilidade de novos conhecimentos e pelas maravilhosas viagens pelo Rio Negro.

A Dra. Ana Paula Lahoz Badiglian e a Dra. Reina Groszmann, por todas as consultas virtuais e por me ajudar a me livrar de todas as “piras” tropicais que entrei em contato.

Aos amigos de Casa, de moradia, de brigas e de festas, Flavia e Cadu, pelo intenso convívio que transformou-nos de estranhos a amigos e companheiros de cotidiano, passando pelas intermináveis “contas” da casa aos prazerosos almoços de domingo.

A Ana Carolina Prado Valladares da Rocha, pela companhia de casa, em Manaus e em Tefé, e pela grande amizade que criamos no ano em que moramos juntas, que persiste e por toda a força até hoje.

Aos Zezinhos, Carlos e Juninho, e especialmente ao meu Zezinho, Daniel, por toda a força, amizade, compreensão, companheirismo, desabafos e “tataias”. Obrigada por me receberem na família Zezinho de braços e corações abertos e partilharem comigo todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos (até choques na lanterna em noite de pizza, carapanãs e mucuras...).

Aos meus irmãos em Manaus, Robertinha e Hada, amigos desde as épocas de Mackenzie, por toda a companhia e compreensão, por estarem ao meu lado sempre que precisei e por tudo que ainda viveremos juntos.

As minhas irmãzinhas de coração que fazem tanta falta no meu dia a dia, Carolina (Cacô) Akkari Torres e Lívia Moreiras Sena, por toda a amizade apesar da ausência e dos poucos momentos vividos nestes dois anos, mas sempre presentes em meus pensamentos e coração, dedicando-me seu tempo integral sempre que retornava a São Paulo, deixando de lado suas dissertações, trabalhos e namorados.

A Angélica, ao Luizão e as meninas, Amandinha e Mari, por todo amor, ajuda, conselhos, companhia, shows do Chiclete, brigadeiros e bolos de chocolate. Obrigada por tornarem minha vida em Manaus mais fácil de ser vivida.

A meus tios, Dráuzio e Maria Helena, e a todos da minha família, pela paciência e maravilhosos conselhos, sempre necessários em toda minha vida e pela saudade que senti durante estes dois anos em Manaus.

Ao meu pai, Clóvis Bevilacqua Júnior, tentando me ajudar, do seu modo de ser, mas sempre de coração.

E principalmente as duas grandes responsáveis pela pessoa que sou hoje, Maria Aurélia Varella e Ana Cristina (Crico) por suportarem minha ausência durante o período do curso e por todas as reclamações de férias curtas. Pela paciência, amizade e amor durante estes 25 anos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em minhas decisões, se preocupando com meu crescimento profissional, deixando de lado toda a saudade e aflição. E a Rebeca, por mesmo sem entender a minha ausência, nunca se esqueceu de todos os momentos vividos por nós.

Aos amigos, novos e velhos, e a todos que estiveram presentes em minha vida.

Por fim, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM e a International Copper Association – ICA pelo apoio financeiro.

Obrigada por tudo!

Abstract

Amazonian water has proper physico-chemical characteristics that interfere directly with metal concentration, competition and complexation, modifying its toxicity. An example of these characteristics is the concentration of dissolved organic carbon that directly affects copper speciation and complexation. Other factors of great importance are low calcium availability and acid pH. The river water parameters, as well as the behavior, the distribution and the diversity of fauna are influenced by the oscillation of river water level, known as floodpulse in the Amazon. To determine the lethal copper concentration in white and black waters of the Amazon, specimens of fish had been exposed to different concentrations of copper, for 96 hours. These experimental results were analyzed relatively to predicted data estimated by the Biotic Ligand Model (BLM). The BLM is a computational program used to predict the bioavailability, and consequently, the toxicity of copper and other metals based on the physico-chemical characteristics of the water in natural environments. The present results evidence a great importance of dissolved organic carbon (DOC) in complexing copper and consequently reducing its bioavailability. Therefore, in black water environments it was observed the highest LC_{50} values, i.e., the lower sensibility of the animals. However, in environments with low DOC levels, the participation of the hardness and alkalinity become more evident, as was the cases of Tefé and Itacoatiara sites, both located in white waters. Our results support the use of the Biotic Ligand Model to predict the toxicity of metals in Amazonian waters. However, more studies are needed to determine the interference of other environmental factors on the bioavailability of copper in aquatic environments and so, to understand the effect of metal contamination in Amazonian waters, an extreme important issue in biological conservation.

Resumo

As águas da Amazônia possuem características físico-químicas próprias que interferem diretamente na concentração, competição e complexação de metais, alterando sua toxicidade. Um exemplo dessas características são as elevadas concentrações de compostos húmicos que podem influenciar a especiação e a complexação de metais, como o cobre. Outros fatores de grande importância são a baixa disponibilidade de cálcio e o pH ácido. Os parâmetros físico-químicos das águas, bem como o comportamento, a distribuição e a diversidade faunística são fortemente influenciados pela oscilação do nível da água nos rios e lagos, em decorrência dos pulsos de inundação na planície amazônica. Com o objetivo de determinar a concentração letal de cobre em águas brancas e pretas da Amazônia, nos rios Solimões, Amazonas e Negro, os peixes foram expostos a concentrações diferentes do metal, durante 96 horas. Os resultados obtidos nos experimentos de toxicidade aguda (CL₅₀-96h) foram comparados aos resultados obtidos utilizando o Modelo do Ligante Biótico (BLM). O BLM é um modelo computacional que tem a finalidade de prever a toxicidade de cobre e de outros metais frente a variações nas características físico-químicas da água em ambientes naturais. Os resultados obtidos demonstram a grande participação do carbono orgânico dissolvido (DOC) na complexação do cobre e consequente redução da toxicidade do metal. Por isso, nas coletas em ambientes de água preta, foram observadas as mais altas CL₅₀. Em ambientes onde o DOC não apresenta altas concentrações, a participação da dureza e alcalinidade torna-se mais notável, caso das coletas em águas brancas de Tefé e Itacoatiara. O BLM demonstrou eficiência na predição da toxicidade do cobre em águas com pH acima de 5, observado nas águas dos rios Solimões e Amazonas. Porém, nas águas ácidas do rio Negro, com valores de pH abaixo de 4,5, o modelo não apresenta a mesma confiabilidade. São necessários estudos adicionais para se calibrar o modelo e também para se determinar a interferência de outros fatores ambientais na toxicidade do cobre em meio aquático ácido. Portanto, estudos adicionais são necessários para que se possa entender os efeitos biológicos do cobre nos ambientes aquáticos da Amazônia, em particular em ambientes extremos como são os ambientes ácidos do Rio Negro.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. O Cobre.....	1
1.2. Águas da Amazônia.....	3
1.3. Substâncias Húmicas Aquáticas.....	5
1.4. Modelo do Ligante Biótico (BLM).....	6
2. Objetivos.....	8
2.1. Geral.....	8
2.2. Específicos.....	8
3. Materiais e Métodos.....	9
3.1. Locais de Coleta.....	9
3.2. Coletas e Análises Limnológicas.....	10
3.3. Determinação da CL ₅₀ -96h do cobre – Toxicidade aguda.....	10
3.4. Análises estatísticas.....	12
3.5. Modelo do Ligante Biótico – BLM.....	12
4. Resultados.....	13
4.1. Características físico-químicas.....	13
4.2. Determinação da toxicidade aguda.....	15
4.3. Sensibilidade ao cobre versus concentrações de DOC.....	18
4.4. Modelo do Ligante Biótico (BLM).....	19
5. Discussão.....	22
5.1. O Modelo do Ligante Biótico.....	26
5.2. Aplicabilidade do Modelo do Ligante Biótico.....	29
6. Conclusão.....	31
7. Referências Bibliográficas.....	32

1. Introdução

A Amazônia abriga grande diversidade biológica no maior complexo hidrográfico do mundo (Sioli, 1990). Apesar dos grandes esforços para sua conservação, este ecossistema, infelizmente, já apresenta pontos focais de contaminação ambiental decorrentes da atividade antrópica. Atividade industrial, de garimpo, extração de petróleo, queimadas, além do crescimento populacional desordenado tem efeito significativo sobre a contaminação dos ambientes naturais por metais de transição na região amazônica (Fearnside, 2003). Neste contexto geral, os metais de transição representam os elementos mais perigosos na contaminação ambiental, pois podem ser incorporados e acumulados na biota (Tarifeno-Silva *et al.*, 1982).

Em ambientes aquáticos, os metais apresentam-se sob a forma iônica, complexada e particulada e podem sofrer transformações químicas no ambiente frente às diferenças nas características da água (Esteves, 1998). O cobre pode ser considerado um dos metais de maior toxicidade (Lloyd, 1992), pois em altas concentrações na forma livre interfere na regulação iônica de peixes (Laurén & McDonald, 1985; Wood, 1992; Playle *et al.*, 1993a; McGeer *et al.*, 2000; Matsuo, 2004; Matsuo *et al.*, 2005).

1.1. O Cobre

O cobre, como elemento-traço, é um metal essencial aos processos metabólicos, pois atua como co-fator para enzimas envolvidas na respiração celular, neurotransmissão, defesa contra os radicais livres, síntese de tecido conjuntivo e no metabolismo celular do ferro (Sorensen, 1991; revisto por Oliveira, 2003; revisto por Matsuo, 2004). No entanto, em elevadas concentrações, o cobre pode ser muito tóxico para peixes (McGeer *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2005). A forma divalente (Cu^{2+}) é considerada a de maior toxicidade, porém outras formas tóxicas incluem CuCO_3 , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$, CuOH^+ , além da forma monovalente, Cu^+ , que pode ser transportada através das membranas biológicas (Paquim *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição de peixes de água doce ao cobre resulta em distúrbios na regulação iônica (Laurén & McDonald, 1985; Matsuo, 2004; Matsuo *et al.*, 2005). Nas brânquias, a toxicidade do cobre está relacionada à inibição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase que resulta, conseqüentemente, na inibição do influxo de sódio na membrana apical (Wood, 1992; Grosell *et al.*, 2002). Em concentrações mais elevadas, o cobre exerce efeito sobre o transporte paracelular, uma vez que compete com os íons Ca^{2+} nas

junções paracelulares afetando a permeabilidade da membrana branquial e, assim, promove o aumento do efluxo de íons (Laurén & McDonal, 1985; McGeer *et al.*, 2000). A toxicidade ocorre quando o acúmulo do metal na brânquia excede uma concentração crítica (Di Toro *et al.*, 2000; Di Toro *et al.*, 2001; Paquim *et al.*, 2002) e resulta na morte do animal, provavelmente, devido às perdas excessivas de Na⁺ e Cl⁻ (Laurén & McDonald, 1985; Wood, 1992; Matsuo *et al.*, 2005).

A toxicidade de metais de transição está intimamente relacionada à sua biodisponibilidade. No ambiente aquático, condições ambientais como concentrações de cálcio, teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) e pH podem interferir diretamente na biodisponibilidade do cobre (Playle *et al.*, 1993ab; Di Toro *et al.*, 2000; Lee, 2000; Paquin *et al.*, 2000; Di Toro *et al.*, 2001; Paquim *et al.*, 2002; Dwyer, 2003; Schamphelaere & Janssen, 2004). A maior toxicidade do cobre em águas com uma menor dureza pode ser explicada pela competição entre o cálcio e o metal pelo mesmo sítio de ação presente no epitélio branquial dos peixes (Playle *et al.*, 1993a; Matsuo *et al.*, 2005). O cobre possui maior afinidade que o cálcio aos sítios de ligação nas junções paracelulares das brânquias; porém, em águas duras, que apresentam maiores concentrações de cálcio, a competição promove a interação do cálcio com os sítios branquiais em detrimento ao cobre (Matsuo, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que a matéria orgânica dissolvida e particulada pode exercer um efeito protetor contra a toxicidade de metais, pois, em geral, ocorre a formação de complexos matéria orgânica-metal resultando na redução da disponibilidade de íons metálicos livres para interagir com os peixes (Wood *et al.*, 2003; Schamphelaere & Janssen, 2004). As interações entre o carbono orgânico dissolvido (DOC) e o cobre são mais fortes que as interações entre o metal e as brânquias (Playle *et al.*, 1993ab; McGeer *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2005).

Por outro lado, o pH ácido pode aumentar a toxicidade do cobre, pois maiores concentrações de H⁺ reduzem a concentração do complexo cobre-carbonatos, aumentando a disponibilidade do metal na forma tóxica, capaz de interagir com os sítios de ligação nas brânquias (Wood, 1992; Playle *et al.*, 1993a; Di Toro *et al.*, 2001; Scamphelaere & Janssen, 2004; Menezes, 2005).

Na região amazônica o cobre pode se originar no ambiente de duas formas: natural ou por ação antrópica. A origem natural é caracterizada quando o metal é proveniente do desgaste por lixiviação de solos ricos em metais e, neste caso, a composição do solo e do sedimento da bacia hidrográfica se reflete na composição da água (Sampaio, 2000). A concentração de cobre em águas da Amazônia, em geral, está abaixo da concentração média mundial para águas

naturais (Damous *et al.*, 2002). A origem antrópica é caracterizada quando a presença do metal está relacionada, particularmente, às atividades de mineração, poluição urbana e descargas da indústria de materiais de construção civil, tintas e peças automobilísticas (Lee, 2000; Sampaio, 2000; Damous *et al.*, 2002; Dwyer, 2003; Horbe *et al.*, 2005; Santana & Barroncas, 2007; Horbe & Oliveira, 2008).

Na Amazônia a atividade de mineração está restrita a poucas áreas, mas suas consequências ambientais podem ser facilmente notadas. Duas atividades de mineração são expressivas na região: a extração de petróleo (Maco, 1996) e de cobre (Damous *et al.*, 2002). O petróleo é extraído às margens do rio Urucu, onde, para cada barril de óleo cru extraído, são gerados 9 barris de água de formação (Maco, 1996). Apesar de grande parte da água ser re-injetada nos poços em atividade, há consequências ambientais, pois a concentração de cobre na água de formação pode chegar a 250µg/L. A maior parte da extração de cobre vem sendo realizada na província mineradora de Carajás, onde pode haver também extração de ouro e ferro em uma área aproximada de 25.000ha, às margens do Rio Salobo. Neste rio as concentrações naturais de cobre são cerca de 3,2 – 3,8µg/L, aumentando para 19µg/L nas proximidades do complexo minerador. Já nos sedimentos, a concentração atinge valores entre 61 e 1.750µg/g (Damous *et al.*, 2002).

Outra fonte antropogênica de cobre para os sistemas hídricos da Amazônia é o aumento da atividade industrial e descargas urbanas (Santana & Barroncas, 2007). As maiores concentrações de cobre podem ser encontradas em igarapés que drenam o pólo industrial de Manaus. Um exemplo é o “Igarapé do 40”, que apresenta níveis de cobre próximos a 1.000µg/L (Sampaio, 2000). Estes valores estão muito acima do permitido pela Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece limite máximo de 9,0µg/L para águas da Classe I, isto é, águas que se destinam ao consumo humano, após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e frutas e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

1.2. Águas da Amazônia

Na Amazônia podemos encontrar três tipos distintos de água: brancas, pretas e claras, com a presença também de tipos intermediários (Sioli, 1984). Essa distinção de águas ocorre devido às diferenças nas propriedades químicas, físicas e biológicas das águas ao longo da bacia (Junk *et al.*, 1989). Estas características retratam as condições do solo e da vegetação que compõem as florestas ao longo de sua bacia hidrográfica (Sioli, 1990). Adicionalmente, os

diferentes tipos de águas da Amazônia possuem condições de pH, alcalinidade, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e quantidade de matéria orgânica dissolvida e particulada muito variável (Junk, 1983; Sioli, 1984; Junk *et al.*, 1989; Sioli, 1990; revisto por Val & Almeida-Val, 1995).

O principal sistema de águas brancas da Amazônia é o rio Solimões. Este sistema carrega grande quantidade de sedimentos lixiviados dos Andes devido aos processos erosivos, deixando as águas com aspecto visual barrento (Sioli, 1990). Em áreas de baixa correnteza, os sedimentos são depositados e a transparência da água aumenta, enquanto em áreas de maior movimentação, a correnteza invade os barrancos carreando mais sedimentos e aumentando a turbidez (Junk, 1983). A região Andina e pré-Andina é formada por sedimentos alcalinos e ricos em sais minerais. Isso se reflete na composição química da água, que possui alta quantidade de sais dissolvidos, pH tendendo ao neutro (Furch & Junk, 1997) e grande quantidade de sólidos totais (Junk, 1983; Furch & Junk, 1997). O teor de cálcio e magnésio destas águas é elevado quando comparado à quantidade de sódio e potássio (Furch, 1997).

As águas pretas e claras estão presentes nos rios que nascem nos escudos arqueados das Guianas e do Brasil central, ou nos sedimentos terciários da bacia amazônica, onde não há significativos processos erosivos. Devido a este fato, as águas transportam menor quantidade de sedimentos e apresentam uma maior transparência (Goulding *et al.*, 1988; Sioli, 1990).

A coloração escura típica das águas pretas é consequência da presença de grandes quantidades de substâncias húmicas e fúlvicas, provenientes principalmente da decomposição de material vegetal originado nas florestas inundáveis (igapós) (revisto por Goulding *et al.*, 1988; revisto por Val & Almeida-Val, 1995). Os compostos orgânicos presentes nas águas podem atingir um valor de 10mgC/l em águas do baixo rio Negro, mas podem alcançar valores de 35mgC/l em igapós (Junk *et al.*, 1989; Sargentini-Junior *et al.*, 2001). Já nas águas claras do Rio Xingú e do Rio Tapajós, que apresentam coloração esverdeada, os compostos húmicos estão adsorvidos a partículas de argila e silte, apresentando baixa concentração dissolvida (Goulding *et al.*, 1988; Sioli, 1990).

As águas pretas apresentam caráter ácido devido à grande quantidade de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF), além da baixa concentração de cálcio e magnésio, e maior presença de sódio e potássio; ainda assim, há uma menor concentração de sais em relação às águas brancas (Sioli, 1990; Furch & Junk, 1997). Em conjunto, as características geológicas e da água são responsáveis pela baixa condutividade elétrica apresentada por estas águas.

1.3. Substâncias húmicas aquáticas

As substâncias húmicas e fúlvicas são quimicamente heterogêneas formadas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais (Sargentini *et al.*, 2001). Apresentam alto peso molecular e são compostas por anéis aromáticos com grupamentos periféricos, constituídos principalmente de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) (Thurman, 1981; Sargentini *et al.*, 2001). Nestes compostos, predominam os grupos funcionais carboxilas, hidroxilas fenólicas e alcoólicas (McKnight & Aiken, 1998; Rocha & Rosa, 2003).

As substâncias húmicas aquáticas (SHA) conferem coloração avermelhada à água e estão presentes em grande quantidade nas águas pretas e em menor quantidade em águas brancas e claras (McKnight & Aiken, 1998). São, em sua maioria, de origem alóctone, levadas às águas pela drenagem de solos arenosos, particularmente durante o período de chuvas (Rocha *et al.*, 1999; Sargentini *et al.*, 2001).

Estes compostos são de extrema importância para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos e representam a maior parte do carbono orgânico dissolvido (DOC) encontrado nas águas, podendo chegar a cerca de 90% deste em alguns igarapés ou lagos de águas pretas (Thurman, 1981; Sargentini *et al.*, 2001). A natureza da água e a variação sazonal nas condições físico-químicas do ambiente são fatores determinantes para a formação e humificação dessas substâncias (Playle *et al.*, 1993b; Rocha & Rosa, 2003).

Um dos aspectos que chama a atenção nos compostos húmicos está relacionado à sua influência na biodisponibilidade de metais e, conseqüentemente, na alteração de sua toxicidade em solos e sistemas hídricos (Playle *et al.*, 1993b; McGeer *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003). Águas com elevada concentração de substâncias húmicas podem agir como um “tampão”, diminuindo a biodisponibilidade de íons metálicos (Sargentini *et al.*, 2001; McGeer *et al.*, 2002; Schamphelaere & Janssen, 2004). Dessa forma, de acordo com suas propriedades físico-químicas, ocorre participação no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas no ambiente (Di Toro *et al.*, 2001, Cunha *et al.*, 2007). As macromoléculas húmicas possuem a capacidade de interagir com os íons metálicos, devido aos rearranjos inter e/ou intramoleculares (Sargentini *et al.*, 2001; Rocha & Rosa, 2003). As SHA também são capazes de atenuar os efeitos da acidez da água sobre os mecanismos de transporte iônico nos peixes, podendo atuar na regulação iônica, por meio de um aumento na capacidade de transporte de íons, mesmo em ambientes com baixas concentrações de cálcio e pH ácido (Playle *et al.*, 1993b; McGeer *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Matsuo, 2004; Schamphelaere & Janssen, 2004).

1.4. Modelo do Ligante Biótico - BLM

O Modelo do Ligante Biótico (BLM), descrito por Di Toro e colaboradores (Di Toro *et al.*, 1999; Paquin *et al.*, 1999; Santore *et al.*, 1999), está baseado em dois modelos anteriormente desenvolvidos, o *Free Ion Activity Model* e o *Gill Surface Interaction Model*, com o objetivo inicial de prever a toxicidade do cobre e da prata e sua interação com os organismos.

O *Free Ion Activity Model* (FIAM) foi o primeiro modelo a descrever a relação existente entre as variações das espécies metálicas e sua biodisponibilidade. Criado por Morel em 1983, este é um modelo genérico e primário, desenvolvido para explicar a interação dos metais nos organismos, utilizando uma fórmula para se determinar o equilíbrio químico (Paquin *et al.*, 2002). Ainda em 1983, Pagenkopf e colaboradores desenvolveram o *Gill Surface Interaction Model* (GSIM) baseado na relação existente entre a dureza da água e a toxicidade de metais, em uma tentativa de interpretar os resultados de testes de toxicidade, quando testados individualmente (Cd, Cu, Pb, Zn) ou associados (Pagenkopf, 1983).

O Modelo do Ligante Biótico incorporou alguns dos fatores do FIAM e do GSIM. O BLM, entretanto, tem o diferencial de levar em consideração o efeito da matéria orgânica presente no ambiente na complexação dos metais, fator não considerado pelos modelos anteriores (Paquin *et al.*, 2000; Paquin *et al.*, 2002).

O BLM prevê a quantidade de íons biodisponíveis que causariam toxicidade, ou seja, a quantidade livre de metal que pode realmente se ligar aos sítios de ligação nas brânquias dos organismos aquáticos exercendo seu efeito tóxico, considerando além das diferenças de biodisponibilidade dos metais, a sua interação com a biota. Isto ocorre como consequência das variações físico-químicas da água e da capacidade de ligação entre os metais e os sítios de ação presentes nas brânquias dos organismos aquáticos (Playle *et al.*, 1993ab; Di Toro *et al.*, 1999; Santore *et al.*, 1999; Di Toro *et al.*, 2000; Paquin *et al.*, 2000; Di Toro *et al.*, 2001; Paquin *et al.*, 2002). O modelo utiliza uma base quantitativa para avaliar a interação competitiva na água entre o ligante biótico (brânquia) e os ligantes abióticos (Ca^{+2} , SHA , OH^- , Cl^- , entre outros). O BLM está baseado na hipótese de que a interação metal–ligante biótico pode ser representada da mesma maneira que as interações do metal com ligantes orgânicos e inorgânicos do meio (Di Toro *et al.*, 1999; Di Toro *et al.*, 2000; Paquin *et al.*, 2000; Paquin *et al.*, 2002).

A membrana branquial pode ser considerada um ligante biótico, pois sua área corresponde a cerca de 50% da superfície corpórea do peixe, estando em contato direto com o ambiente aquático (Di Toro *et al.*, 1999; Paquin *et al.*, 2000). As brânquias representam a principal estrutura de transferência de íons entre o ambiente e os fluidos internos dos peixes e

alterações em sua fisiologia podem gerar distúrbios na homeostase do organismo (Paquim *et al.*, 2002; Dwyer, 2003). Isso ocorre devido ao epitélio branquial ser a principal membrana biológica onde os ligantes químicos aderem, interrompendo o processo de transporte iônico (Lee, 2000; McGeer *et al.*, 2000; Di Toro *et al.*, 2001; Dwyer, 2003). Portanto, qualquer alteração físico-química na água pode ser detectada, permitindo ao peixe desenvolver ajustes ou adaptações em função das características do meio onde se encontra (Wood, 1992).

Com isso a presente proposta testou a viabilidade do Modelo do Ligante Biótico, utilizado originalmente em águas doce de ambientes temperados, na determinação da toxicidade do cobre em corpos d'água da Amazônia, com diferentes características físico-químicas. A utilização do modelo representará uma importante alternativa para o acompanhamento contínuo da qualidade da água e dos níveis de contaminação dos ecossistemas aquáticos da região.

2. Objetivos

2.1. Geral

Testar a aplicabilidade do Modelo do Ligante Biótico para a determinação da toxicidade do cobre em diferentes águas da Amazônia (branca e preta).

2.2. Específicos

1- Determinar a toxicidade do cobre em diferentes tipos de água da Amazônia (águas brancas, pretas e após o encontro das águas).

2- Avaliar o papel do ciclo hidrológico (cheia e seca) na toxicidade do cobre em diferentes águas da Amazônia.

3- Avaliar a aplicabilidade do Modelo do Ligante Biótico em águas da Amazônia por meio da comparação dos resultados de CL_{50-96h} obtidos experimentalmente em espécies de peixes de ambientes naturais com os dados gerados pelo BLM.

3. Material e Métodos

3.1. Locais de coleta

Para a avaliação da aplicabilidade do BLM em diferentes tipos de água da região, foram coletados dados físico-químicos em cinco locais ao longo da bacia amazônica, sendo um ponto em água branca, três em água preta e um após a mistura de águas pretas do Rio Negro e as águas brancas do Rio Solimões (Figura 1). Os locais de coletas forma selecionados de acordo com a distância da cidade de Manaus, coletando nos principais grandes rios (aproximadamente 600km) e após o encontro das águas no rio Amazonas (aproximadamente 200Km). Foram coletadas 10 amostras de água para cada ponto de coleta. A coleta de água branca e os experimentos foram realizados no Rio Solimões, nas proximidades da cidade de Tefé; a amostra coletada após a mistura das águas pretas e brancas foi realizada no Rio Amazonas nas proximidades da cidade de Itacoatiara. As amostras de água preta foram coletadas no Rio Negro, nas proximidades da cidade de Santa Isabel do Rio Negro e Barcelos e no Parque Nacional de Anavilhanas. As coletas foram realizadas em duas fases do ciclo hidrológico: no pico da cheia (maio em Tefé, junho em Itacoatiara e agosto em Barcelos, Santa Isabel do Rio Negro e PARNA Anavilhanas) e na seca (outubro em Tefé, novembro em Itacoatiara e dezembro em Barcelos).



Figura 1. Locais de coleta de água e peixes no rio Solimões (Tefé - $03^{\circ}20'386''S-64^{\circ}41'363''W$); Negro (Santa Isabel do Rio Negro - $0^{\circ}24'503''S-65^{\circ}01'201''W$, Barcelos - $0^{\circ}57'596''S-62^{\circ}55'368''W$ e no PARNA Anavilhanas - $02^{\circ}43'031''S-60^{\circ}45'341''W$); e Amazonas (Itacoatiara - $03^{\circ}08'513''S-58^{\circ}27'331''W$). (Fonte: googlemaps.com)

3.2. Coleta de água e análises limnológicas

Em cada ponto de amostragem realizou-se a coleta de água para análise das seguintes características físico-químicas: pH, temperatura, alcalinidade, dureza, cloretos, concentração de carbono orgânico dissolvido, cálcio, potássio, magnésio, sódio e cobre total.

O pH e a temperatura foram mensurados nos locais de coleta com o auxílio de um pHmetro *YSI* modelo 100. A dureza foi analisada pelo método de titulação das amostras previamente tamponadas com EDTA até o ponto de viragem na coloração com o indicador negro de eriocromo e os resultados foram expressos em miligramas de carbonato de cálcio por litro (mgCaCO_3/L) segundo protocolo da APHA (1998); a análise de cloreto foi realizada de acordo com o método colorimétrico e os resultados foram expressos em microgramas/L, seguindo protocolo 4500-Cl E da APHA (1998); a análise de alcalinidade total foi realizada pelo método de titulação com ácido sulfúrico 0,02N (2540D - APHA, 1998) e calculada segunda a fórmula: $\text{Alcalinidade}(\text{meq/L}) = V \cdot N \cdot 1000 / \text{volume da amostra}$, onde N é a normalidade do ácido empregado e V é o volume do ácido utilizado, sendo os valores expressos em miligramas de carbonato de cálcio por litro (mgCaCO_3/L).

Para a determinação da concentração dos níveis de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ e cobre total, a água dos rios foi coletada e analisada por meio de espectrofotometria de absorção atômica no equipamento *Perkin Elmer Analyst 800*, no modo chama, utilizando mistura de ar comprimido e acetileno como combustível, de acordo com as instruções do fabricante. O equipamento foi calibrado para cada elemento. A quantificação de cobre, quando pertinente, foi realizada no mesmo equipamento, usando-se forno de grafite (FGAAS).

Para a quantificação de carbono orgânico dissolvido, foi coletada uma amostra da água de cada rio estudado, em frascos de vidro âmbar com capacidade para 100ml, acidificadas com ácido nítrico 1% ($\text{pH} < 2$) e mantidas sob refrigeração ($\sim 4^\circ\text{C}$) até serem analisadas de acordo com metodologia descrita pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA 5310B, 1998), utilizando um analisador de carbono orgânico total (Shimadzu, Japão), na Universidade de Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS.

3.3. Determinação da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ do cobre – Toxicidade aguda

Os testes de toxicidade que avaliam a mortalidade dos organismos-teste em curto prazo (teste agudo ou letal) expressam seu resultado em concentração letal (CL_{50}) (CETESB, 1986). Estes testes determinam a concentração da substância-teste que causa a mortalidade ou imobilização (CE_{50}) de 50% dos indivíduos testados (Aragão & Araújo, 2006).

Os experimentos para a determinação da CL_{50-96h} do cobre foram realizados de acordo com a metodologia adotada para os testes de toxicidade aguda com peixes em sistema de fluxo contínuo, baseada nas normas da CETESB (1990) e USEPA (1994). Os testes foram realizados utilizando água branca (Rio Solimões – Tefé), água preta (Rio Negro - Santa Isabel do Rio Negro, Barcelos e Parque Nacional de Anavilhanas) e após a mistura de águas pretas e brancas (Rio Amazonas - Itacoatiara). A água e os peixes utilizados nos testes foram coletados em ambiente natural e os experimentos foram realizados no próprio local de coleta, imediatamente após a coleta.

Os peixes utilizados nos experimentos pertenciam à Ordem Characiformes, considerada por Lowe-McConnel (1999) como a Ordem de maior importância em águas da Amazônia. Foram coletados com rede específica para pequenos animais, escolhidos de acordo com a abundância no local, com esforço de coleta que garantisse uma quantidade mínima de peixes do mesmo gênero para cada bateria de testes. Na água branca foram utilizados exemplares de *Hemigramus bellote*, nos experimentos realizados em Itacoatiara foram utilizados exemplares de *Hyphessobrycon* sp e em águas pretas, *Paracheirodon axelrodi*.

Os experimentos foram realizados em 10 aquários contendo 10 indivíduos cada, em duplicatas, com aeração constante e densidade de 0,8g de peixes/L. Os aquários possuíam um sistema de fluxo contínuo com vazão ajustada para a troca total da água do recipiente a cada 24 horas. O elemento cobre foi utilizado sob a forma química de cloreto de cobre di-hidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) e a solução estoque foi preparada com 24 horas de antecedência, mantida sob agitação até o momento do teste, possibilitando a integral complexação do cobre com os elementos do meio.

Os animais foram aclimatados durante 24h em água do ambiente de coleta, aerada artificialmente. Após este período, os peixes foram expostos a 10 concentrações de cobre, variando de 0,02 a 5.540,00 μ gCu/L (concentração real), durante 96 horas. A mortalidade dos peixes e os parâmetros físico-químicos da água foram mensurados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (CETESB, 1986).

O programa computacional LC_{50} *Programs JSpearman test*, que se baseia no método *Trimmed – Spearman Karber* (Hamilton *et al.*, 1977), foi utilizado para a determinação do valor da CL_{50-96h} e dos intervalos de confiança (95%) correspondentes. O descarte do material seguiu as normas legais, que determinam a eliminação do metal por precipitação por hidroxilação alcalina com hidróxido de cálcio para posterior descarte da água superficial (CETESB, 1990).

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos para as características físico-químicas são expressos como média e erro padrão da média. Foi utilizado Teste *t* com a finalidade de comparar os resultados obtidos em cada tipo de água em períodos hidrológicos diferentes. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via para determinar as diferenças nos resultados obtidos para cada localidade no mesmo período hidrológico. Havendo indicação de significância de 95% ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de *Tukey* para discriminar essa diferença (Zar, 1984).

3.5. Modelo do Ligante Biótico - BLM

O programa computacional *Biotic Ligand Model – version 2.2.3* (Di Toro *et al.*, 2000) foi utilizado para a determinação da concentração letal esperada para as condições ambientais mensuradas na água de cada ambiente avaliado, que inclui: temperatura, pH, alcalinidade, DOC, Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Cl^- . Os dados gerados pelo programa e obtidos experimentalmente foram plotados em um gráfico para avaliar a similaridade entre os valores de $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ observado e predito. Para avaliar quais parâmetros estavam exercendo maior influência nos dados gerados pelo modelo, foram feitas simulações com os dados obtidos alterando-se apenas os parâmetros pH e/ou porcentagem de ácidos húmicos.

4. Resultados

4.1. Características físico-químicas

As características físico-químicas médias dos pontos amostrados nos diferentes tipos de água e nos diferentes períodos hidrológicos estão apresentadas na tabela 1. A temperatura da água amostrada no rio Solimões, Negro e Amazonas variou de 27,5 a 30,1°C, sendo os maiores valores encontrados durante a seca. Os valores obtidos nas amostras de água preta e em ambientes de mistura apresentaram diferenças significativas entre os períodos de cheia e seca (Tabela 1).

O pH determinado para a água branca, incluindo as amostras de Itacoatiara, tendeu à neutralidade, com valores entre 5,7 e 6,9. Já nos pontos amostrais em águas pretas houve uma tendência à acidez, com valores que variaram entre 3,3 e 4,5. Há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os períodos hidrológicos amostrados, sendo os valores mais ácidos de pH encontrados durante a cheia (Tabela 1).

As concentrações de cobre total na água mensurados em amostras não filtradas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) durante o período de seca nas águas brancas e pretas, aumentando mais de duas vezes em águas brancas e mais de cinco vezes em águas pretas. As menores concentrações foram encontradas em águas pretas (2,67µg/L em Anavilhanas); porém, a maior concentração foi observada também em água preta, na cidade de Barcelos durante a seca (15,12µg/L).

Em relação aos íons sódio, magnésio, cálcio e potássio, as maiores concentrações foram observadas em Itacoatiara durante o período de cheia. A menor concentração de íons foi observada em Barcelos durante o período seco (Tabela 1). Em relação aos demais íons, Tefé apresentou maior proporção de íon sódio durante o período cheio e maior proporção de potássio durante a seca. Quando comparados ambos os períodos hidrológicos, a seca apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de sódio, cálcio e potássio em relação ao período de cheia. Em Itacoatiara, entretanto, o cálcio apresentou a maior proporção em relação aos demais íons em ambos os períodos hidrológicos. Nestes locais observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de sódio e cálcio e uma diminuição na concentração de potássio durante a seca. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores encontrados para cloreto e dureza neste período.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante a cheia e a seca em cinco diferentes pontos da bacia Amazônica.

		Tefé		Itacoatiara		Barcelos		Santa Isabel	Anavilhanas
		Rio Solimões - água branca		Rio Amazonas – água branca		Rio Negro – água preta		Rio Negro	Rio Negro
		Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Seca	Cheia	Cheia
Temperatura	(°C)	29,7 ± 0,29 A	30,1 ± 0,72a	28,6 ± 0,15 B*	29,8 ± 0,19a	28,8 ± 0,44 B*	29,6 ± 0,07a	27,5 ± 0,07 C	29,0 ± 0,18 B
pH		5,73 ± 0,07 A*	6,73 ± 0,14 a	6,54 ± 0,06 B*	6,97 ± 0,13 a	3,33 ± 0,24 C	3,56 ± 0,20 b	4,48 ± 0,17 D	4,54 ± 0,73 D
Cobre	(µg/L)	4,47 ± 0,99 A*	10,39 ± 0,97 a	4,07 ± 0,31 A	4,01 ± 0,33 b	2,83 ± 0,33 B*	15,12 ± 1,36 c	3,12 ± 0,31 C	2,67 ± 0,25 B
Sódio	(µg/L)	610,4 ± 29,99 A*	2000,20 ± 16,24 a	2710,0 ± 5,71 B*	3395,00 ± 29,18 b	328,2 ± 3,47 C	329,80 ± 8,62 c	415,4 ± 3,41 D	673,4 ± 5,78 E
Magnésio	(µg/L)	181,4 ± 7,37 A	178,20 ± 4,97 a	1213,8 ± 15,23 B	1220,60 ± 49,09 b	125,8 ± 0,86 C*	107,20 ± 1,92 c	143,0 ± 1,26 AC	279,0 ± 1,84 D
Cálcio	(µg/L)	284,0 ± 18,16 A*	412,0 ± 8,60 a	3030,0 ± 19,74 B*	3944,0 ± 64,65 b	288,0 ± 19,34 A*	480,0 ± 9,48 b	244,0 ± 14,35 A	550,0 ± 12,65 C
Potássio	(µg/L)	620,6 ± 15,9 A*	932,00 ± 30,98 a	1030,4 ± 14,71 B*	692,20 ± 11,67 b	370,4 ± 8,58 CD	214,60 ± 4,34 c	420,4 ± 2,75 D	564,6 ± 6,61 AC
Cloretos	(µg/L)	580 ± 29,0 A	680 ± 10,43 a	1930 ± 70,0 B*	4400 ± 31,0 b	261,0 ± 5,26 A*	200,0 ± 3,52 c	164,0 ± 9,74 A	347,0 ± 2,38 A
Dureza	(mgCaCO ₃ /L)	2,31 ± 0,37 A	2,31 ± 0,37 a	19,85 ± 0,92 B*	29,46 ± 0,37 b	2,22 ± 0,31 A*	1,07 ± 0,12 c	1,96 ± 0,083 A	2,56 ± 0,07 A
Alcalinidade	(mgCaCO ₃ /L)	7,6 ± 1,52 A	8,0 ± 0,71 a	22,4 ± 0,89 B	22,6 ± 1,14 b	2,0 ± 0,70 C	1,8 ± 0,83 c	1,8 ± 0,84 C	2,2 ± 0,84 C
DOC	(mgC/L)	3,51A	2,63a	3,60A	2,59a	7,90B	9,91b	7,55B	7,68B

Valores expressos como média e erro padrão da média. Letras maiúsculas (A, B, C, D, E) representam as diferenças significativas entre as localidades durante o período de cheia e as letras minúsculas (a, b, c) representam as diferenças entre as localidades durante o período de seca. Os asteriscos (*) representam as diferenças significativas em uma mesma localidade em períodos hidrológicos diferentes ($p < 0,05$).

A água preta coletada em Barcelos apresentou maiores proporções de cálcio durante o período de seca e maiores proporções de sódio durante o período de cheia. As concentrações de cálcio aumentaram e as de magnésio diminuíram significativamente ($p < 0,05$) durante o período seco. Os níveis de cloreto e dureza da água foram estatisticamente mais elevados ($p < 0,05$) no período de seca, em relação ao período de cheia.

Comparando os diferentes tipos de água durante a seca, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de íons e nos demais parâmetros analisados. O sódio e o potássio apresentaram concentrações elevadas nos pontos amostrados no rio Negro; no entanto, as amostras de Itacoatiara apresentaram valores elevados de cálcio.

As maiores concentrações de carbono orgânico dissolvido foram observadas nos pontos amostrais ao longo do rio Negro, sendo a maior concentração observada em Barcelos durante o período seco. Nos pontos amostrados na água branca (Tefé e Itacoatiara) as maiores concentrações foram observadas durante a cheia.

4.2. Determinação da toxicidade aguda

Para a determinação da CL_{50-96h} de cobre, em água branca, os experimentos foram realizados com exemplares da espécie *Hemigramus bellote* - rosa-céu (pesando $0,342 \pm 0,016g$), sendo encontrados valores de CL_{50-96h} de $229,71 \mu gCu/L$ com limites inferior e superior de 189,54 e $278,40 \mu gCu/L$ durante a cheia, e $460,31 \mu gCu/L$ com limites de 438,46 e $483,25 \mu gCu/L$ durante a seca. Em Itacoatiara, a CL_{50-96h} para os exemplares de *Hyphessobrycon* sp – piaba ($0,533 \pm 0,021g$) foi $464,74 \mu gCu/L$ com limites inferior e superior de 378,02 e $571,35 \mu gCu/L$ durante o período de cheia e $238,49 \mu gCu/L$ com limites de 148,59 e $382,78 \mu gCu/L$ durante o período seco. Em água preta os experimentos foram realizados com espécimens de *Paracheirodon axelrodi* - cardinal tetra ($0,243 \pm 0,009g$), onde foram observados valores de CL_{50-96h} de $1701,27 \mu gCu/L$ com limites inferior e superior de 1494,13 e $1937,13 \mu gCu/L$; $1841,06 \mu gCu/L$ com limites de 1526,67 e $2220,20 \mu gCu/L$ e $1030,41 \mu gCu/L$ com limites de 942,55 e $1126,45 \mu gCu/L$ durante a cheia nas cidades de Barcelos e Santa Isabel do Rio Negro e no Parque Nacional de Anavilhanas, respectivamente. Durante o período de seca, o experimento foi realizado apenas em Barcelos e a CL_{50-96h} encontrada foi de $558,05 \mu gCu/L$ com limites inferior e superior de 441,59 e $705,23 \mu gCu/L$. Com base nos valores obtidos pelo *LC₅₀ Programs JSpearman test*, foram estimados os valores de CL_{50-96h} e o intervalo de segurança para 24, 48, 72 e 96 horas de exposição (Figura 2 e 3).

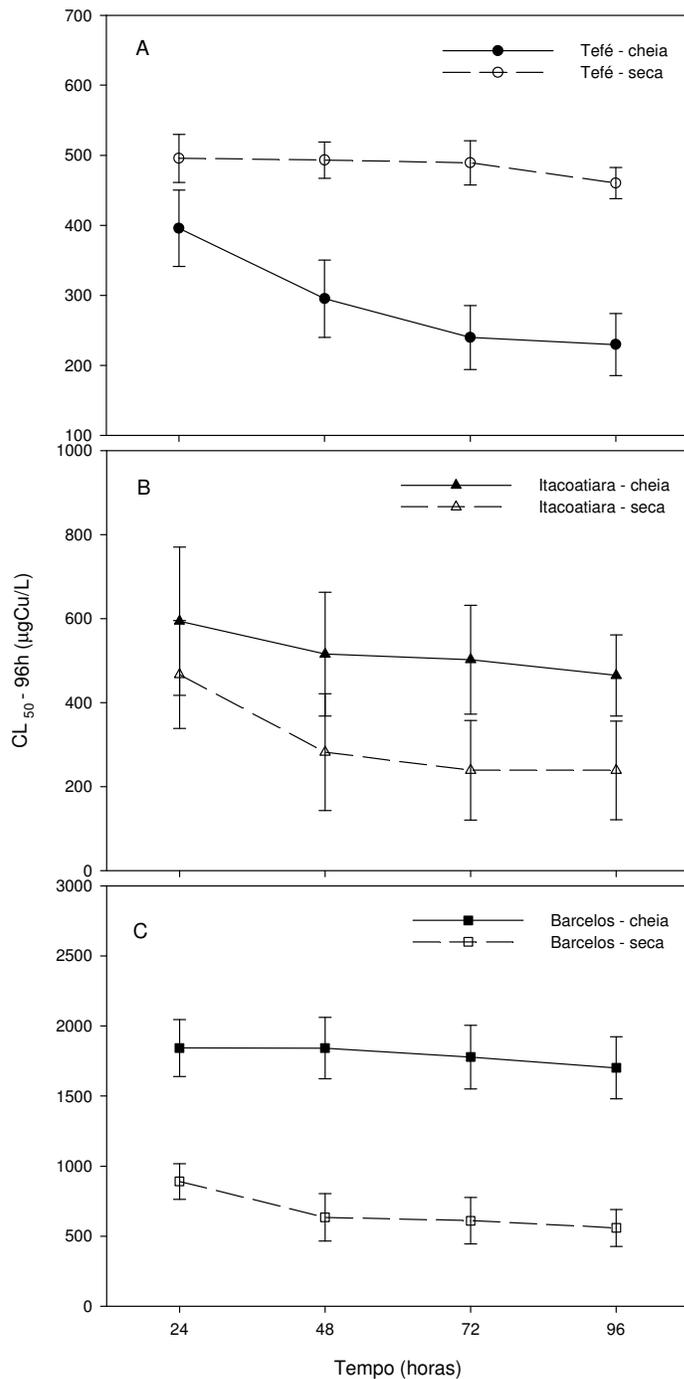


Figura 2. Relação entre a CL_{50} e o tempo de exposição e seus intervalos de confiança (95%). Experimentos conduzidos em (A) Tefé, água branca; (B) Itacoatiara, água branca após o encontro das águas e (C) Barcelos, água preta.

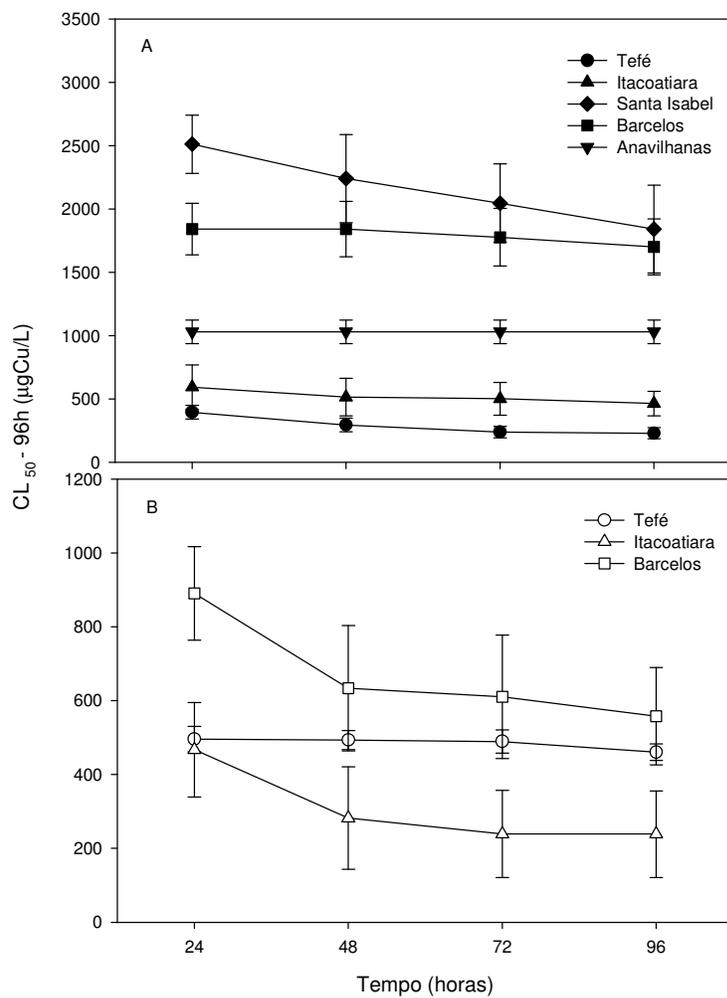


Figura 3. Relação entre a CL_{50} e o tempo de exposição e seus intervalos de confiança (95%). **(A)** experimentos realizados durante o período de cheia; **(B)** experimentos realizados durante o período de seca.

O decréscimo do valor de CL_{50} ao longo do tempo de exposição é esperado, uma vez que para causar 50% de mortalidade em um menor espaço de tempo são necessárias maiores concentrações do agente (Heath, 1995).

4.3. Toxicidade do cobre versus concentrações de DOC

A toxicidade do cobre total apresentou-se reduzida em Barcelos durante o período cheio, onde o carbono orgânico dissolvido apresentou menores concentrações em comparação ao período seco. Já em Tefé, a menor disponibilidade do cobre aos animais foi observada durante a seca, de acordo com os valores de DOC, que apresentaram concentrações mais elevadas. Já em Itacoatiara, apesar dos menores valores de DOC durante a seca, a toxicidade do cobre foi maior (Figura 4).

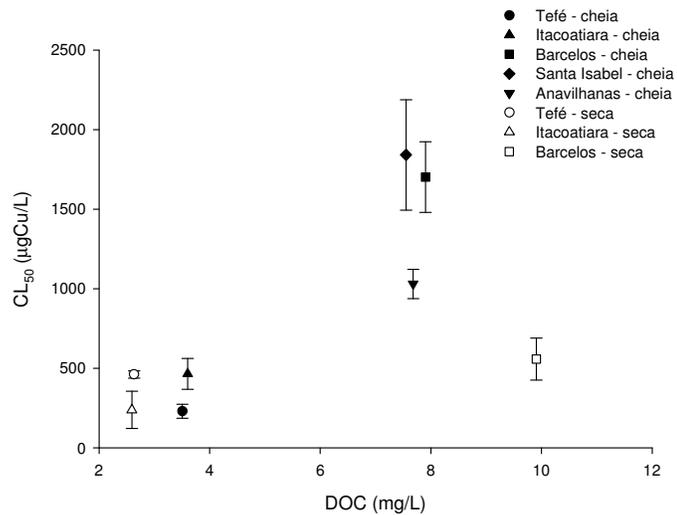


Figura 4. Relação entre os valores de CL₅₀ determinados para as espécies analisadas e concentrações de DOC dos locais de coleta.

4.4. Modelo do Ligante Biótico (BLM)

Utilizando o programa computacional *Biotic Ligand Model – version 2.2.3* foi determinada a CL_{50-96h} esperada para os três ambientes e para os dois períodos hidrológicos amostrados, baseado nos dados de temperatura, pH, alcalinidade, DOC, Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Cl^- . A figura 5 apresenta a relação existente entre o valor de CL_{50-96h} predita pelo modelo e a CL_{50-96h} observada em cada ponto de coleta nos dois períodos hidrológicos.

A figura 6 representa os valores de CL_{50-96h} observado e predito pelo modelo utilizando as características físico-químicas originais dos pontos de coleta em três diferentes concentrações de ácidos húmicos. A porcentagem de ácidos húmicos foi pré-estabelecida em 40% para utilização regular no BLM. Os valores de 60 e 75% foram escolhidos aleatoriamente nas modelagens subsequentes (Sargentini Junior *et al.*, 2001).

Há influência das porcentagens de ácidos húmicos na determinação da toxicidade do cobre pelo BLM. Note que quanto maior a concentração de AH, maior será o valor de CL_{50-96h} predito pelo modelo (Figura 7). Na figura 7 há a representação gráfica da previsão dos valores de CL_{50-96h} quando há variação na concentração de AH em um pH constante (5,7). Observe que as melhores previsões do modelo estão entre 30 e 40% de ácidos húmicos. Quando há variação de pH, há menor influência das AH na determinação da CL_{50} pelo modelo. Na figura 8, os valores preditos pelo modelo que mais se aproximam do observado em experimentos de campo são obtidos em pH entre 5 e 6.

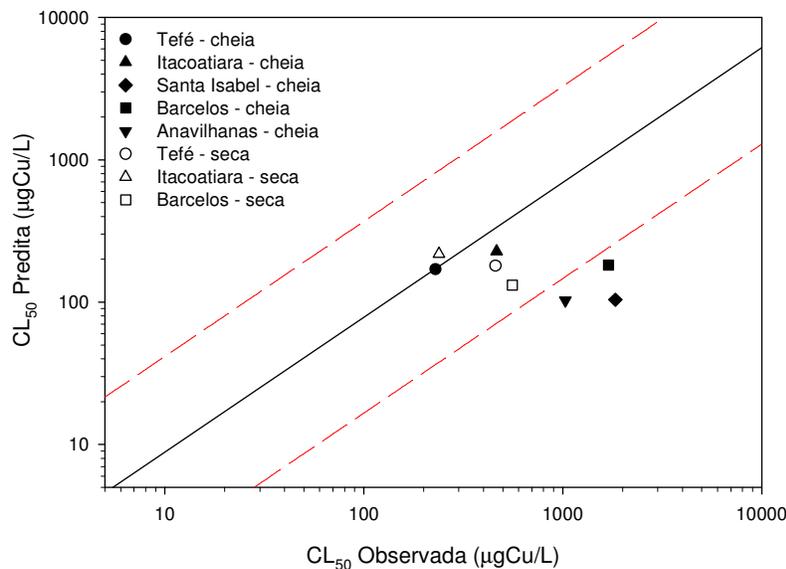


Figura 5. Comparação entre CL_{50-96h} obtida experimentalmente e a gerada pelo BLM para os dados originais coletados em campo.

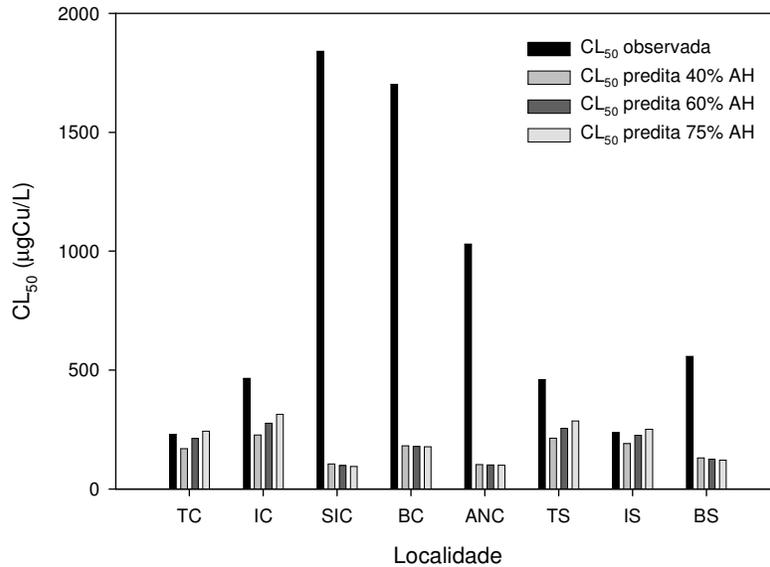


Figura 6. CL₅₀-96h observada e predita pelo BLM utilizando os valores originais de pH com variações na porcentagem de ácidos húmicos nas diferentes localidades. **TC:** Tefé – cheia, **IC:** Itacoatiara – cheia, **SIC:** Santa Isabel – cheia, **BC:** Barcelos – cheia, **ANC:** Anavilhanas – cheia, **TS:** Tefé – seca, **IS:** Itacoatiara – seca, **BS:** Barcelos – seca.

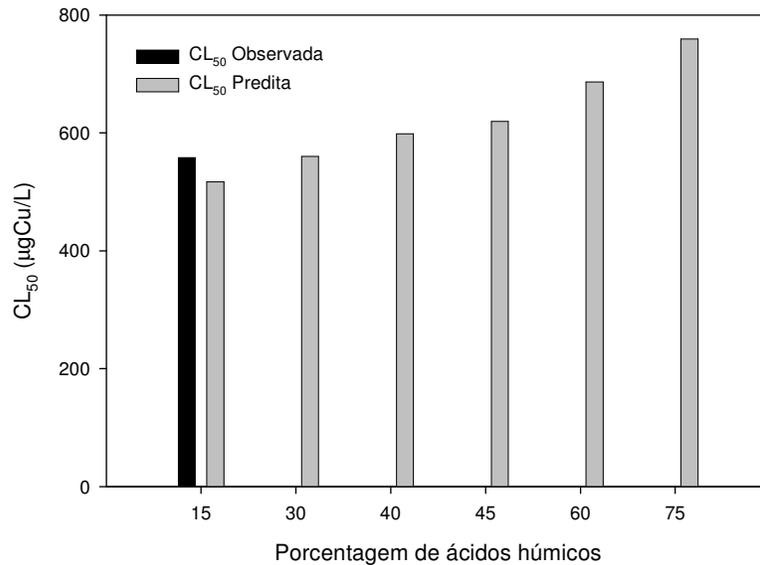


Figura 7. Representação do valor de CL₅₀-96h predito pelo BLM quando pH é corrigido para 5,7, em diferentes porcentagens de ácidos húmicos.

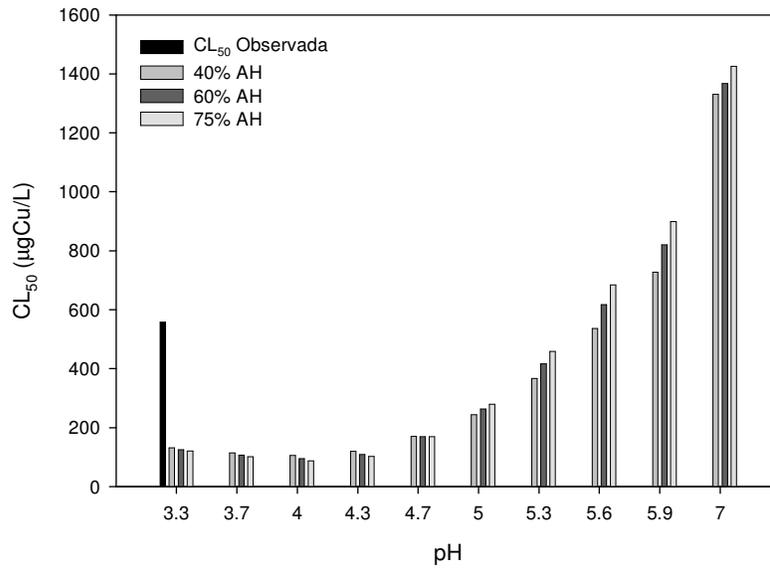


Figura 8. Representação da CL₅₀-96h predita pelo BLM com diferentes valores de pH e em três proporções de ácidos húmicos.

5. Discussão

Os estudos sobre a toxicidade de agentes contaminantes refletem uma preocupação científica atual, visto que são freqüentes os casos de contaminação de ecossistemas aquáticos por descartes de resíduos químicos, agrícolas e efluentes urbanos. Os testes de toxicidade são realizados com o objetivo de estabelecer os limites máximos permissíveis para compostos tóxicos e ainda avaliar o impacto desses compostos sobre o ambiente e os organismos (Bertoletti, 1990).

Experimentos laboratoriais de toxicidade são utilizados como uma ferramenta para investigar possíveis alterações em ambientes naturais decorrentes da contaminação antrópica e criar subsídios para controlar estas alterações (Aragão & Araújo, 2006). Estes experimentos são realizados utilizando animais experimentais em condições artificiais controladas. Por outro lado, ao se trabalhar nas condições locais pode-se descartar as possíveis modificações que a água sofreria ao ser transportada até o laboratório. Assim, é possível avaliar situações que ocorrem em ambientes naturais característicos da Amazônia.

O cobre tem recebido grande atenção da comunidade científica por ser considerado um dos metais potencialmente mais tóxicos para peixes (Lloyd, 1992; McGeer *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2005). Muitas espécies de peixes têm sido utilizadas para avaliação da toxicidade do cobre, sendo a maioria de regiões temperadas (Laurén & McDonald, 1985; Playle *et al.*, 1993ab; McGeer *et al.*, 2000; McGeer *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2005). Poucas espécies tropicais têm sido analisadas e apenas recentemente iniciaram-se os estudos envolvendo espécies amazônicas (Damato, 1997; Mazon, 1997; Mazon & Fernandes, 1999; Oliveira, 2001; Oliveira, 2003; Matsuo, 2004; Matsuo *et al.*, 2005; Menezes, 2005; Rodrigues, 2006; Matsuo & Val, 2007; Duarte *et al.*, 2009).

O presente trabalho visou avaliar a toxicidade do cobre em ambientes amazônicos por meio de testes de toxicidade aguda e os valores de CL₅₀-96h obtidos apresentaram grande variação em comparação aos trabalhos citados anteriormente. Dentre os experimentos realizados em água preta, as análises em Santa Isabel do Rio Negro revelaram o valor mais elevado de CL₅₀, enquanto em Tefé (rio Solimões) e Itacoatiara (rio Amazonas), observaram-se os menores valores CL₅₀-96h.

Neste caso, pode-se afirmar que essas variações na toxicidade são decorrentes principalmente das características físico-químicas da água e não só de caracteres individuais da espécie, já que variações dentro de uma mesma família tendem a ser menores, tendo como

base o trabalho de Duarte *et al.* (2009) sobre a sensibilidade ao cobre de peixes ornamentais da Amazônia. Essas variações nas características físico-químicas são muito importantes na determinação da toxicidade, pois influenciam diretamente os processos de complexação e competição do cobre em meio aquático, afetando, por conseguinte, sua biodisponibilidade e sua toxicidade (Lloyd, 1992; Playle *et al.*, 1993ab; Di Toro *et al.*, 2000; Lee, 2000; Paquin *et al.*, 2000; Di Toro *et al.*, 2001; Paquim *et al.*, 2002; Dwyer, 2003; Schamphelaere & Janssen, 2004).

Esta diferença na toxicidade em decorrência de variações nas características físico-químicas da água está de acordo com a literatura, onde alterações no pH, nos teores de carbono orgânico dissolvido, na dureza, na alcalinidade e na quantidade de sólidos em suspensão são fatores responsáveis pelas variações nas respostas à contaminação por cobre em ambientes aquáticos (Lloyd, 1992; Wood, 1992; Playle *et al.*, 1993ab; Di Toro *et al.*, 2001; McGeer *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Matsuo *et al.*, 2004; Schamphelaere & Janssen, 2004; Matsuo *et al.*, 2005).

De acordo com Playle *et al.* (1993a), qualquer característica ambiental que previna a absorção inicial pela superfície das brânquias, quer pela redução na concentração de metal livre, quer pela redução no número de sítios de ligação, irá reduzir a toxicidade de metais livres dissolvidos na água. No ambiente aquático, o cobre pode se associar a partículas presentes na água, formando complexos inorgânicos (carbonatos e hidróxidos) e orgânicos (na presença de matéria orgânica natural, aminoácidos, ácidos húmicos e fúlvicos) (Sorensen, 2000). A formação de complexos reduz a disponibilidade do íon cobre livre no meio, diminuindo, assim, a quantidade relativa de cobre capaz de interagir com o sítio de ligação no epitélio branquial dos organismos, o que por sua vez reduz a toxicidade desse metal (Paquin *et al.*, 2000).

Os experimentos realizados nas águas pretas do rio Negro, representados por três pontos de coleta durante a cheia e um ponto durante a seca, apresentaram os maiores valores de CL₅₀-96h, acompanhados de altas concentrações de carbono orgânico dissolvido. A menor toxicidade do cobre aos animais observada em ambientes de água preta, ricos em matéria orgânica dissolvida, pode ser explicada pela capacidade de ligação entre o cobre e a matéria orgânica, resultando na formação de complexos e na redução da concentração de cobre iônico livre capaz de se associar ao epitélio branquial dos peixes causando toxicidade (Playle *et al.*, 1993ab; Paquin *et al.*, 2000; McGeer *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Matsuo *et al.*, 2004; Schamphelaere & Janssen, 2004; Matsuo *et al.*, 2005).

O pH ácido, típico das águas dos rios de água preta, aumenta a concentração de cobre iônico livre por impedir a formação de hidróxido de cobre (Paquin *et al.*, 2000). Além da participação dos íons H^+ , a acidez da água prejudica a formação de carbonatos de cobre e complexos cobre-matéria orgânica, favorecendo a maior biodisponibilidade do cobre. Nestas águas o baixo pH é decorrente principalmente da presença de ácidos húmicos e fúlvicos, constituintes majoritários da matéria orgânica. Com isso, o efeito tóxico do pH pode ser compensado pela alta concentração de carbono orgânico dissolvido apresentado pelas águas pretas. Nos ambientes de água preta o maior pH foi observado em Santa Isabel do Rio Negro, onde foi observado também o mais alto valor de CL_{50} (Wood, 1992; Playle *et al.*, 1993a; Di Toro *et al.*, 2001; Rocha & Rosa, 2003; Scamphelaere & Janssen, 2004).

Nos experimentos realizados em ambientes de água branca, no rio Solimões (em Tefé) e no rio Amazonas (em Itacoatiara), foram observados os menores valores de CL_{50} , ou seja, a maior toxicidade de cobre aos animais, independente da fase do ciclo hidrológico. Isto, provavelmente, ocorre devido a uma menor concentração de matéria orgânica dissolvida e menor complexação desta com o cobre, resultando em maiores concentrações de cobre iônico livre capaz de se ligar à brânquia.

Além da participação do DOC, há outras características ambientais que podem interferir na toxicidade do cobre. A alcalinidade e a dureza são importantes fatores de modulação da toxicidade do cobre. Os cátions cálcio e magnésio são capazes de competir com os metais pelos sítios de ligação na brânquia dos peixes reduzindo, também, a toxicidade do metal ou metais presentes (Playle *et al.*, 1993a; Sorensen, 2000; Paquin *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2005). Os ambientes de água branca e aqueles sob sua influência, de maneira geral, apresentam maior concentração de íons e dureza mais elevada em comparação com os ambientes de água preta. Nestes, não há grande participação da dureza na redução da toxicidade do cobre, que ocorre, principalmente, devido à complexação com a matéria orgânica (Matsuo & Val, 2007). Em geral, estas concentrações observadas na água branca estão bem abaixo da concentração observada em águas de ambientes temperados, onde não é visível este efeito protetor.

A maior concentração de íons, principalmente cálcio, observada nas coletas realizadas em Itacoatiara, exerce um efeito protetor nos peixes, pois há uma competição do Ca^{2+} pelos mesmos sítios de ação utilizados pelo Cu^{2+} presentes nos organismos (Playle *et al.*, 1993a; Matsuo *et al.*, 2005). Em ambiente onde o cálcio está mais concentrado (maior dureza da água), haverá uma maior tendência de ligação deste à brânquia. Além do efeito protetor do

cálcio, o aumento da dureza resulta na formação de complexos cobre-carbonatos reduzindo a concentração de íon cobre capaz de se ligar a brânquia (Paquin *et al.*, 2000). Em ambientes onde há baixas concentrações de cálcio e magnésio haverá maior interferência de carbonatos e hidróxidos na formação de complexos de cobre, porém em águas duras haverá maior participação da alcalinidade na proteção dos peixes em face da toxicidade do cobre (Sorensen, 2000). O cálcio apresentou as maiores concentrações em água branca. O segundo local com maior concentração de cálcio foi Anavilhanas, que apesar de estar localizada em ambiente tipicamente de águas pretas, durante o período de cheia sofre influência direta do rio Branco, sistema de água branca a montante do ponto de coleta (Sioli, 1990).

O alto teor de sólidos em suspensão, importante característica de águas brancas (Junk, 1983; Sioli, 1990), apesar de não ter sido quantificado experimentalmente, pôde ser observado visualmente principalmente em Tefé e Itacoatiara. De acordo com Sorensen (2000), areia, barro e argila em suspensão são capazes de adsorver o cobre livre presente no ambiente aquático, diminuindo a toxicidade do metal. Apesar da alta concentração de cálcio e sólidos em suspensão apresentada por estas águas, neste trabalho foi observada uma maior toxicidade do cobre, possivelmente devido à menor concentração de compostos orgânicos.

A ocorrência natural de cobre apresentou padrão de aumento durante a seca semelhante na água branca e na água preta. As concentrações encontradas podem ser consideradas elevadas para os padrões da região, porém ainda abaixo da média mundial e de valores encontrados em ambientes impactados (Damous *et al.*, 2002).

Koumrouyan & Santana (2008) determinaram as concentrações totais de elementos-traço em sedimentos de um lago de inundação do rio Solimões, não observando variações sazonais nas concentrações de cobre, que ficaram em torno de 85µg/L. Silva e colaboradores (1999) estudaram a distribuição de metais de transição em sedimentos de igarapés próximos a Manaus, atribuindo as elevadas concentrações de cobre às atividades industriais e efluentes domésticos. Estes mesmos autores encontraram maiores concentrações no período chuvoso, fato não observado neste estudo, onde as maiores concentrações foram encontradas durante a coleta no período de seca, fato que pode ser atribuído a menor diluição de águas durante esta fase do ciclo hidrológico.

Sargentini Junior e colaboradores (2001) estudaram a complexação de cobre por substâncias húmicas aquáticas, observando uma concentração de 38,5µg/L de cobre dissolvido no rio Negro, entre os rios Tarumã e Tarumã Mirim. Este mesmo rio foi estudado por Santana & Barroncas (2007) que observaram grande influência do aterro sanitário na

presença de metais de transição na água e no sedimento. A concentração de cobre na água apresentou valores que variaram entre 77 e 100µg/L, enquanto no sedimento os valores estiveram entre 95 e 1919µg/L. Honda (2006) observou concentrações máximas de 3,6µg/L em igarapés impactados pela atividade de extração de petróleo e não impactados na região do rio Urucu. Sampaio (2000) estudou igarapés de regiões impactadas pela atividade antrópica próximos a Manaus, onde as concentrações de cobre na água apresentaram valores próximos a 1.000µg/L. Damous e colaboradores estudaram o rio Salobo, onde os valores a montante da Província Mineradora de Carajás, no Pará, apresentaram variações entre 3,2 e 3,8µg/L, porém a jusante as concentrações se elevaram para 19µg/L.

5.1. O Modelo do Ligante Biótico

Este trabalho avaliou a capacidade do Modelo do Ligante Biótico na previsão da toxicidade do cobre por meio da competição e complexação com substâncias orgânicas e inorgânicas presentes nos ambientes aquáticos naturais. O BLM é capaz de prever a concentração de metal associado com o ligante biótico, calculado com base na concentração de metal em associação a outros ligantes presentes no meio. O BLM é uma ferramenta que gera uma diretriz básica para prever a redução da toxicidade do cobre com o aumento da concentração natural de matéria orgânica, carbonatos e pH (Paquin *et al.*, 2002).

Os resultados gerados nos experimentos realizados em diferentes águas da Amazônia demonstraram íntima relação entre o pH e a capacidade de predição da toxicidade do cobre pelo Modelo do Ligante Biótico. O BLM demonstrou eficiência em águas com pH acima de 5, observado nas águas brancas do rio Solimões e nas águas do rio Amazonas. Nestes locais os valores de pH variaram entre 5,7 e 6,9. Porém, nas águas ácidas do rio Negro (valores de pH entre 3,3 e 4,5), o modelo não apresentou a mesma consistência observada quando aplicado com as características das águas brancas. Em águas de pH abaixo de 5, os valores de CL₅₀-96h preditos e observados apresentaram diferença de cerca de dez vezes.

Aparentemente, nas condições iniciais de desenvolvimento do programa, o BLM foi calibrado para utilizar valores de pH com intervalo entre 6 e 8 (Schamphelaere & Janssen, 2002). De acordo com o guia de utilização do programa, o modelo foi desenvolvido e calibrado para uma variação de pH de 4,9 a 9,2 (HydroQual, Inc., 2007); por isso, a predição da toxicidade do cobre em pH fora deste intervalo pode ser prejudicada. Schamphelaere & Janssen (2002) observaram em experimentos com *Daphnia* em pH acima de 8, que os valores de toxicidade predita excedem em até duas ordens de magnitude o valor observado de CE₅₀.

Os autores sugerem que o BLM pode estar superestimando o valor de CE_{50} nestes experimentos. Nos experimentos em água ácidas do rio Negro, com valores de pH menores que 5, foi observada uma situação inversa, porém com os mesmos princípios, onde o valor de CL_{50} foi subestimado em relação ao valor observado. Isso demonstra que o pH, aparentemente, é uma característica crucial à capacidade de previsão do BLM.

Para melhorar a predição da toxicidade do cobre em águas ácidas da Amazônia, há a necessidade de ajustes na fórmula principal do programa que passe a levar em consideração valores de pH abaixo de 5. Adicionalmente, propomos testar as mesmas características físico-químicas da água utilizadas para aplicar o programa, porém com valor de pH 5,7, menor valor de pH encontrado nas águas brancas. A figura 5 apresenta os valores de CL_{50-96h} predito e observado para cada localidade plotada em um gráfico contendo valores de CL_{50-96h} predito e observado para outras espécies de peixes amazônicos. Podemos notar que os pontos em preto, onde não houve alteração nos valores originais, estão fora do intervalo de confiança do modelo. Porém, quando corrigimos o pH e a porcentagem de ácidos húmicos, os pontos vermelhos se encaixam no limite de confiança do BLM.

Aliado à elevação nos valores de pH, elevamos também a concentração de ácidos húmicos de 40 para 60%. A figura 6 mostra que apenas a variação na porcentagem de ácidos húmicos em pH ácido não é suficiente para uma correção adequada na previsão do modelo, onde os valores de toxicidade predita ainda continuaram muito abaixo da CL_{50} observada. Porém quando aliamos à variação na concentração de AH uma variação nos valores de pH, nota-se que o modelo passa a ser capaz de uma melhor previsão na toxicidade do cobre. Na figura 8 observa-se a variação no valor de CL_{50-96h} predito em função das variações tanto na proporção de ácidos húmicos como no pH. Em pH acima de 5, a proporção de ácidos húmicos presentes no sistema não apresenta grande importância. No entanto, quando variamos apenas a concentração de AH em pH 5,7, há uma elevação no valor de CL_{50} predito, mostrando que quando dentro do valor de detecção do modelo, a quantidade de AH altera a previsão da toxicidade do cobre (Figura 7).

A alteração na porcentagem de ácidos húmicos nos pontos de coletas no rio Negro foi baseado na maior capacidade de transporte de ácidos orgânicos pelas águas pretas. De acordo com Ertel *et al.* (1986) há maior fluxo de ácidos húmicos vindo do rio Negro e seus tributários e estes contribuem em cerca de 2,5 vezes a capacidade de “input” do rio Solimões. As águas pretas possuem altos níveis de DOC, sendo mais da metade composto por substâncias húmicas, com altos níveis de carbono. Em coletas realizadas no rio Amazonas, os autores

relataram haver diferenças nas fontes que compõem o carbono orgânico total e dissolvido. Ainda, podemos assumir que a matéria orgânica dissolvida é composta por frações de tamanhos moleculares diferentes que são capazes de complexar quantidades variáveis de metais (Sargentini Junior *et al.*, 2001; Bryan *et al.*, 2002). Como há diferenças na composição e no tipo de matéria orgânica entre os rio Negro e Solimões, estes dados devem ser levados em consideração na utilização do modelo para previsão da toxicidade do cobre em águas da Amazônia (Ertel *et al.*, 1986; Schamphlaere *et al.*, 2002).

A figura 9 representa os resultados obtidos e esperados para os experimentos realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) no âmbito do Projeto Cobre, durante os anos de 2005 a 2008. Os pontos em cinza representam experimentos realizados com as espécies de peixes amazônicos (Caracídeos: *Brycon amazonicus*, *Carnigella strigata*, *Colossoma macropomum*, *Hemigrammus rodostomus*, *Hyphessobrycon socolofi*, *Paracheiroidon axelrodi*; Ciclídeos: *Apistogramma agassizzi*, *A. trifasciatus*, *A. hyppolytae*, *Dicrossus maculatus*; Siluriformes: *Corydoras schwartzi*, *Dianema urostriatum*, *Otocinclus hasemani*) em águas do poço do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e sob diferentes concentrações de DOC. Os pontos em preto representam os experimentos realizados em campo nas diferentes localidades nos dois períodos hidrológicos. Nota-se que há três pontos fora do intervalo de confiança do modelo, representando as três coletas feitas em água preta no período cheio, onde foram observados os maiores valores de CL₅₀-96h nos menores valores de pH. Os pontos em vermelho representam as mesmas localidades, porém os valores de pH abaixo de 4,9 foram ajustados para 5,7; nestes mesmos locais a concentração de ácidos húmicos foi ajustada para 60%. Este valor de AH foi escolhido aleatoriamente, visto que não há registros na literatura que descrevam valores de AH tão elevados para a região.

Este estudo é o primeiro a testar em campo a utilização do Modelo do Ligante Biótico em águas ácidas de ambientes tropicais. O modelo, originalmente desenvolvido para ambientes temperados, ainda necessita de estudos sobre sua aplicabilidade e viabilidade nesses ambientes. Entretanto, dados gerados no presente trabalho em conjunto com aqueles obtidos sob condições laboratoriais demonstram que o BLM pode ser uma alternativa viável para a predição da toxicidade do cobre.

Apesar da resposta positiva a respeito da viabilidade do modelo em ambientes controlados, há ainda grande necessidade de novos estudos capazes de identificar outros ligantes presentes em águas naturais capazes de interferir na biodisponibilidade do cobre. Os

sólidos em suspensão bem como as frações de ácidos orgânicos, por exemplo, são características ambientais não consideradas pelo modelo, mas que interferem na biodisponibilidade do cobre, sendo necessário saber os níveis desta interferência para assim incluí-las no modelo.

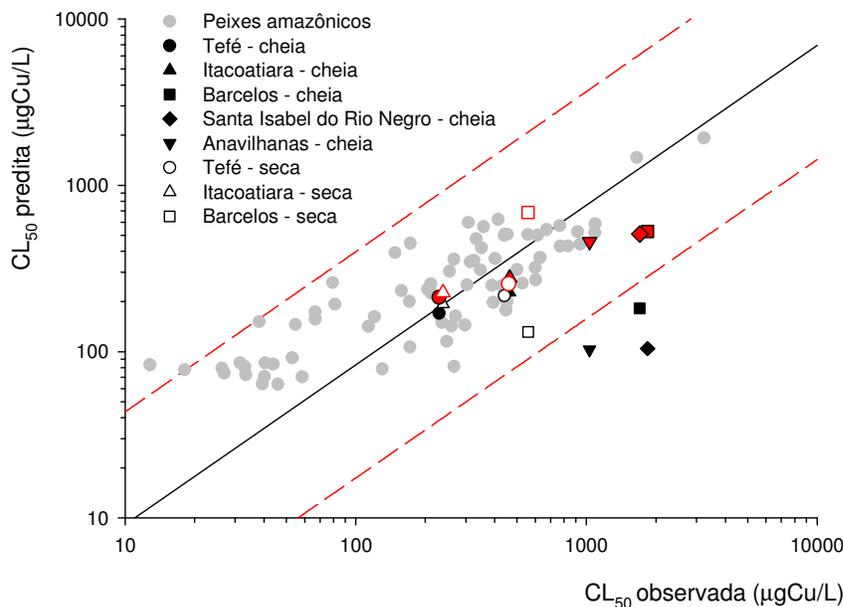


Figura 9. Comparação da CL₅₀-96h obtida experimentalmente nas cinco localidades e a gerada pelo BLM para os dados originais coletados em campo (em preto), para os dados de campo corrigidos (em vermelho) e os para os peixes amazônicos testados em laboratório em água do poço do INPA e em várias diluições de água do rio Negro. Formas geométricas iguais representam as mesmas localidades.

5.2. Aplicabilidade do Modelo do Ligante Biótico

Anteriormente, os padrões de qualidade de água para metais traço eram baseados simplesmente na concentração total de metal na água. Estudos sobre a química de metais em ambientes aquáticos geraram subsídios para se adotar como padrão os níveis de metais dissolvidos (Genderen *et al.*, 2008). Devido aos experimentos serem realizados em ambientes de laboratório controlados, com concentração constante de sais, e sem a interferência de matéria orgânica ou sólidos em suspensão, os padrões consideravam a quantidade total de metal iônico dissolvido e eram indiferentes à química da água. Porém, a toxicidade observada em laboratório era muito maior quando comparada a ambientes naturais (Niyogi & Wood,

2004). Por isso houve a necessidade de estudos que abordassem o comportamento de metais em associação e suas possíveis interações, visto que em ambientes contaminados, normalmente há toxicidade associada de metais (Niyogi & Wood, 2004).

A partir dos anos 70 e 80, as agências de proteção ambiental americana e européia desenvolveram critérios diferentes para a qualidade ambiental de águas doces e marinhas, considerando a dureza e a salinidade da água respectivamente (Niyogi & Wood, 2004; Natale *et al.*, 2007; Reiley, 2007). Outros parâmetros foram incorporados, baseados em estudos de fisiologia e toxicologia que demonstram a interação entre metais e ambiente aquático, até a criação de modelos que predizem a toxicidade de metais baseados nas características ambientais. Estes modelos levam em consideração variáveis importantes na determinação da toxicidade de metais que podem ser mensurados e indentificados no ajuste do programa.

Os resultados destes estudos podem ser utilizados como ferramenta para a criação e atualização de políticas públicas (Natale *et al.*, 2007). Países como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Chile e Argentina passaram a incorporar os dados gerados pelo Modelo do Ligante Biótico sobre a competição, complexação e concentração de metais de transição no estabelecimento de políticas sobre os padrões de qualidade de água e em programas de conservação ambiental (Wood, 2008). No Brasil, há ainda necessidade do estabelecimento de políticas públicas que levem em consideração as características bióticas e abióticas dos corpos d'água de cada região, tendo em vista um acompanhamento contínuo da qualidade ambiental, bem como a criação de novas diretrizes para a fiscalização de emissões de efluentes e descargas de poluentes em ambientes aquáticos.

Estabelecendo-se um robusto conjunto de dados para validar o BLM em águas da Amazônia para predizer a toxicidade do cobre, não haveria necessidade de utilização de testes de toxicidade em organismos vivos, gerando uma alternativa mais econômica, prática e rápida para se obter respostas em relação à contaminação aquática. O modelo possibilitaria, dessa forma, um monitoramento constante da qualidade da água para garantir a conservação da biodiversidade da Amazônia.

6. Conclusões

- A toxicidade do cobre aos peixes é menor em águas pretas (maiores valores de CL_{50}) quando comparados aos demais tipos de água analisados.
- Em relação ao ciclo hidrológico, a toxicidade do cobre apresentou-se maior durante a seca e menor durante a cheia em águas pretas e em Itacoatiara, provavelmente devido a maior interferência do carbono orgânico dissolvido nestes ambientes. Em água branca a toxicidade do cobre apresentou padrão invertido (ou seja, menor toxicidade durante seca e maior durante a cheia), sugerindo maior interferência dos íons (cátions), dureza e alcalinidade na sensibilidade dos animais.
- O BLM demonstrou maior eficiência em prever a toxicidade do cobre em águas brancas do rio Solimões e para águas do rio Amazonas (pH acima de 5). Porém, em águas ácidas do rio Negro (valores de pH entre 3,3 e 4,5) o modelo apresentou maior incerteza.
- Para ser utilizado como uma ferramenta eficaz e viável para a determinação da toxicidade do cobre em diferentes águas da Amazônia, o BLM deve ser calibrado para as características típicas da região, particularmente o baixo pH e as altas concentrações de carbono orgânico dissolvido.

7. Referências Bibliográficas

- APHA 2540B. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20 Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- APHA 4500-C1 E. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20 Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- APHA 5310B. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20 Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Aragão, M.A.; Araújo, R.P.A. 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *In: Zagatto, P.A. e Bertoletti, E. Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. Ed. Rima, São Carlos.
- Bertoletti, E. 1990. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Ciência e Cultura*, 42:271-227.
- Bryan, S.E.; Tipping, E.; Hamilton-Taylor, J. 2002. Comparison of measured and modeled copper binding by natural organic matter in freshwaters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Parte C (133):37-49.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. 1986. *Desenvolvimento de métodos para o estabelecimento de critérios ecotoxicológicos*. Relatório Final. v.2.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. 1990. *Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. Série Manuais.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 1986. Resolução nº 357 de 17/03/2005.
- Cunha, T.J.F.; Madari, B.; Benites, V.; Canellas, L.P.; Novotny, E.; Moutta, R.O.; Trompowsky, P.M.; Santos, G.A. 2007. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico de Amazônia (terra preta). *Acta Amazonica*, 37(1):91-98.
- Damato, M. 1997. Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na sua toxicidade, empregando diferentes espécies indicadoras. Tese de doutorado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Departamento de Engenharia Hidráulica. 336.
- Damous, N.R.; Wagener, A.L.R.; Patchineelam, S.R.; Wagener, K. 2002. Baseline studies on water and sediments in the copper mining region of Salobo-3A, Carajás – Amazon, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 13:140-150.
- Di Toro, D.M.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Paquin, P.R.; Santore, R.C. 1999. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. I. Technical basis. Section 3. *In: Di Toro,*

- D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. (Ed.) *Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments*. USEPA – 822-E-99-001. 102p.
- Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. 2000. Background and rationale for the Biotic Ligand Model (BLM) of the acute toxicity of copper. *In: Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. (Ed.) The Biotic Ligand Model*. International Copper Association, Ltd., USA. p. 1-6.
- Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals: technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:2383-2396.
- Duarte, R.M.; Menezes, A.C.L.; Rodrigues, L.S.; Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. 2009. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 72(3):693-698.
- Dwyer, R. 2003. Predicting the toxicity of metals to aquatic organisms: an introduction to the biotic ligand model. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, USA. 105pp.
- Ertel, J.R.; Hedges, J.I.; Devol, A.H.; Richey, J.E. 1896. Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography*, 31(4):739-754.
- Esteves, F.A. 1998. *Fundamentos de limnologia*. 2 Ed. Interciência, Finep, Rio de Janeiro. 602p.
- Fearnside, P.M. 2003. *A floresta Amazônica nas mudanças globais*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus – AM. 134p.
- Furch, K. 1997. Chemistry of Várzea and Igapó Soils and Nutrient Inventory of their Floodplains Forests. *In: Junk, W.J. (Ed.) The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 47-68.
- Furch, K.; Junk, W.J. 1997. Physicochemical Conditions in the Floodplains. *In: Junk, W.J. (Ed.) The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 69-108.
- Genderen, E.V.; Adams, W.; Cardwell, R.; van Sprang, P.; Arnold, R.; Santore, R.; Rodriguez, P. 2008. An evaluation of the bioavailability and aquatic toxicity attributed to ambient copper concentration in surface waters from several parts of the world. *Environmental Assessment and Management*, 4(4):416-424.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L.; Ferreira, E.G. 1988. *Rio Negro, Rich life in poor water*. SPB Academic Publishing. 200p.
- Grosell, M.; Nielsen, C.; Bianchini, A. 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Parte C (133):287-303.
- Hamilton, M. A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 11 (7), 714-719.

- Heath, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. 2 Ed. CRC Press, Lemis publishers. 342p.
- Honda, R.T. 2006. Cádmio: Indução da metalotioneína e efeito sobre a afinidade da hemoglobina com o oxigênio em peixes da Amazônia. *Tese de Doutorado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 204pp.
- Horbe, A.M.C.; Gomes, I.L.F.; Miranda, S.A.F.; Silva, M.S.R. 2005. Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus-AM. *Acta Amazônica* 35:119-124.
- Horbe, A.M.C.; Oliveira, L.G.S. 2008. Química de igarapés de água preta do nordeste do Amazonas – Brasil. *Acta Amazônica* 38:753-760.
- HydroQual, Inc., 2007. User's guide and reference manual. Biotic Ligand Model, Windows Interface, Version 2.2.3.
- Junk, W.J. 1983. As águas da região amazônica. In: Junk, W.J. (Ed). *Amazonia: Desenvolvimento integração e ecologia*. Edit. Brasiliense, Brasil. p.45-100.
- Junk, W.J.; Bayley, P.B.; Sparks, R.E. 1989. The flood pulse concept in the river floodplain systems. In: Dodge, D.P. (Ed.) *Proceedings of the international large river symposium*. Canadian Special Publication Fishing and Aquatic Sciences, 106. 110-127p.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology*, 155:635-644.
- Lee, C.M. 2000. Assessing the effects of copper in the environmental. In: Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. (Ed.) *The Biotic Ligand Model*. International Copper Association, Ltd., USA. p. 1-6.
- Lloyd, R. 1992. *Pollution and freshwater fish*. The Buckland Foundation, Oxford. 176p.
- Lowe-McConnel, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EdUSP, São Paulo, 535pp.
- Maco, J.T. 1996. Influências da água de formação da extração de petróleo do rio Urucu sobre aspectos hematológicos e conteúdo iônico de *Colossoma macropomun* e *Glyptoperichthys ioselimaianus*. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 99p.
- 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/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 204pp.
- Matsuo, A.Y.O.; Playle, R.C.; Val, A.L.; Wood, C.M. 2004. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: Sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and softwater. *Aquatic Toxicology*, 70:63-81.
- Matsuo, A.Y.O.; Wood, C.M.; Val, A.L. 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*, 74:351-364.

- Matsuo A.Y.O.; Val, A.L. 2007. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. *Journal of Fish Biology*, 70:989-1000.
- Mazon, A.F. 1997. *Efeitos do íon cobre sobre o curimatá Prochilodus scrofa*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 160p.
- Mazon, A.F.; Fernandes, M.N. 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(6):797-804.
- McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50: 231-243.
- McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. 2002. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C(133):147-160.
- McKnight, D.M.; Aiken, G.R. 1998. Sources and age of aquatic humus. In: Hessen, D.O. & Tranvik, L.J. *Ecological Studies: Aquatic humic substances*. 310p.
- Menezes, A.C.L. 2005. Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8. *Dissertação de mestrado*, INPA/UFAM, Manaus, AM, 71p.
- Morel, F.M. 1983. *Complexation: trace metals and microorganisms*. Principles of Aquatic Chemistry.
- Natale, O.E.; Gómez, C.E.; Leis, M.V. 2007. Application of the Biotic Ligand Model for regulatory purposes to selected rivers in Argentina with extreme water-quality characteristics. *Environmental Assessment and Management*, 3(4):517-528.
- Niyogi, S.; Wood, C.M. 2004. Biotic Ligand Model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science and Technology*, 38(23):6177-6192.
- Oliveira, C.P.F. 2003. Efeito do cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – AM, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Dissertação de Mestrado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 84pp.
- Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science and Technology*. 17:342-347.
- Paquin, P.R.; Di Toro, D.M.; Santore, R.C.; Trivedi, D.; Wu, K.B. 1999. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. III. Application to fish and *Daphnia* exposure to silver. Section 3. In: Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. (Eds). *Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments*. USEPA – 822-E-99-001. 102p.

- Paquin, P.R.; Santore, R.C.; Wu, K.B.; Kavvadas, C.D.; Di Toro, D.M. 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environmental Science and Policy*, 3(S):175-182.
- Paquin, P.R.; Gorsuch, J.W.; Apte, S.; Batley, G.E.; Bowles, K.C.; Campbell, P.G.C.; Delos, C.G.; Di Toro, D.M.; Dwyer, R.L.; Galvez, F.; Gensemer, R.W.; Goss, G.G.; Hogstrand, C.; Jansen, C.R.; McGeer, J.C.; Naddy, R.G.; Playle, R.C.; Santore, R.C.; Schneider, U.; Stubblefield, W.A.; Wood, C.M.; Wu, K.B. 2002. The Biotic Ligand Model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environmental Science and Policy*, 3(S): 175-182.
- Playle, R.C.; Dixon, D.G.; Burnison, K. 1993a. Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 50:2678-2687.
- Playle, R.C.; Dixon, D.G.; Burnison, K. 1993b. Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 50:2667-2676.
- Reiley, M.C. 2007. Science, policy, and trends of metals risk assessment at EPA: How understanding metals bioavailability has changed metals risk assessment at US EPA. *Aquatic Toxicology*, 84:292-298.
- Rocha, J.C.; Sargentini Jr., E.; Toscano, I.A.S.; Rosa, A.H.; Burba, P. 1999. Multi-method study on aquatic humic substances from the "Rio Negro", Amazonas State, Brazil. Emphasis on molecular-size classification of their metal contents. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 10:169-75.
- Rocha, J.C.; Rosa, A.H. 2003. *Substâncias húmicas aquáticas. Interação com espécies metálicas*. Ed. Unesp. São Paulo. 120p.
- Rodrigues, L.S. 2006. Efeitos tóxicos do cobre no cardinal tetra (*Pracheirodon axelrodi* SCHULTZ, 1956). *Dissertação de Mestrado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 56pp.
- Sampaio, A.Q. 2000. Caracterização física e química dos sedimentos na área do Distrito Industrial de Manaus (AM). *Dissertação de Mestrado*, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM. 81pp.
- Santana, G.P.; Barroncas, P.S.R. 2007. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu (AM). *Acta Amazonica*, 37(1): 111-118.
- Santore, R.C.; Di Toro, D.M.; Paquin, P.R. 1999. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. II. Application to fish and *Daphnia* exposure to copper. Section 3. In: Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. (Eds). *Integrated Approach to Assessing the Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments*. USEPA – 822-E-99-001. 102p.
- Sargentini-Junior, E.; Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Zara, L.F.; Santos, A. 2001. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. *Química Nova*, 24(3):339-344.

- Schamphelaere, K.A.C.; Heijerick, D.G.; Janssen, C.R. 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Parte C, 133:243-258.
- Schamphelaere, K.A.C.; Jansen, C.R. 2004. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5): 1115-1122.
- Silva, M.S.R.; Ramos, J.P.; Pinto, A.G.N. 1999. Metais de transição nos sedimentos de igarapés de Manaus-AM. *Acta Limnologica Brasiliensis*, 11:89-100.
- Sioli, H., 1984. The Amazon and its main affluents Hydrography, morphology of river courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.) *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publisher, Dordrecht, Netrherlands. p.127-165.
- Sioli, H. 1990. *Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Vozes, Brasil. 72pp.
- Sorensen, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. Boca Raton, CRC, 374p.
- Tarifeno-Silva, E.; Kawasaki, L.; Yn, D.P.; Gordon, M.S.; Chapman D.J. 1982. Aquacultural approaches to recycling dissolved nutrients in secondarily treated domestic waste water: uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. *Water Research*, 16:59-65.
- Thurman, E.M.; Malcolm, R.L. 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science Technology* 15:463-466.
- U.S.EPA. 1994. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organism*. 3 Ed, Washington, D.C., EPA – 600-4-91-002.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon e their Environmental*. Springer, Germany. 224p.
- Wood, C.M. 1992. Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic toxicology*, 22:239-264.
- Wood, C.M.; Matsuo, A.Y.O.; Wilson, R.W.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Playle, R.C.; Val, A.L. 2003. Protection by natural blackwater against disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(1):12-27.
- Wood, C. 2008. The biotic ligand model: Using physiology, geochemistry, and modeling to predict metal toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte C: Toxicology & Pharmacology*, 148(4):468-469.
- Zar, J.K. 1984. *Biostatistical analysis*. 2 Ed. 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](#)