



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL - SP**



**Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em
Oreochromis niloticus, *Ceriodaphnia dubia* e
*Pseudokirchneriella subcapitata***

Jakeline Galvão de França

Bióloga

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP (CAUNESP), como parte das exigências para a obtenção do Título de DOUTOR em Aquicultura, área de concentração em Aquicultura.

Jaboticabal

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL - SP**

**Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em
Oreochromis niloticus, *Ceriodaphnia dubia* e
*Pseudokirchneriella subcapitata***

Jakeline Galvão de França

**Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva
Co-Orientador: Dr. Julio Vicente Lombardi**

Jaboticabal

2009

F237e França, Jakeline Galvão de
Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em
Oreochromis niloticus, Ceriodaphnia dubia e Pseudokirchneriella
subcapitata / Jakeline Galvão de França. -- Jaboticabal, 2009
xiii, 97 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Banca examinadora: Flávio Ruas de Moraes, Carlos Massatoshi
Ishikawa, Claudinei da Cruz, Cíntia Badaró Pedroso

Bibliografia

1. Toxicidade. 2. Permanganato de potássio. 3. Sanidade. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.531:634.0

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em *Oreochromis niloticus*, *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*”

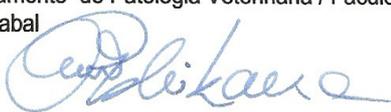
AUTORA: JAKELINE GALVÃO DE FRANÇA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA

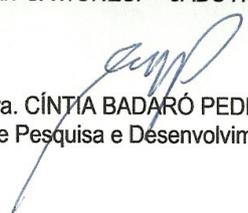
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AQUICULTURA ,
pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA
INSTITUTO DE PESCA DE SÃO PAULO, SP


Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. CARLOS MASSATOSHI ISHIKAWA
INSTITUTO DE PESCA DE SÃO PAULO


Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ
NEPEAM/FCAV/UNESP - JABOTICABAL


Profa. Dra. CÍNTIA BADARÓ PEDROSO
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo

Data da realização: 29 de julho de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta oportunidade de realizar um grande desafio de vida.

A Profa. Dra. Maria José T. Ranzani Paiva e ao Dr. Julio V. Lombardi pela orientação, incentivo, ensinamentos, confiança e amizade. Pessoas maravilhosas tanto na área científica quanto pessoal, que os considero como exemplos.

A minha grande amiga e irmã de coração Solange de Carvalho pela sua valiosa amizade e pelo grande apoio em todos os momentos difíceis ou alegres.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes, Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa, Dr. Claudinei da Cruz e a Dra. Cíntia Pedroso Badaró pela grande contribuição e valiosas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Ao CAUNESP (Centro de Aquicultura da Unesp) pela oportunidade e confiança oferecida.

Ao Instituto de Pesca de São Paulo, APTA/SAA pela infra-estrutura e apoio cedidos para a realização dos experimentos.

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

Ao Prof. Dr. Ciro Alberto Oliveira Ribeiro e ao Dr. Francisco Filipak Neto (Universidade Federal do Paraná) pela infra-estrutura e pelas análises bioquímicas e histológicas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo incentivo a pesquisa e pela bolsa concedida.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo incentivo a pesquisa e pelo auxílio do projeto concedido.

A Veralice, uma grande amiga e sempre disposta em todos os momentos.

Aos amigos, Daniellê Carla Dias, Fernanda Donoso, Marina Delbon, Natália Caruso, Luciana Miashiro, Luis Evangelista e João Alexandre, pela amizade, pelos momentos divertidos e pela grande ajuda durante a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que participaram de alguma forma neste trabalho e principalmente às pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Aos que deixei de agradecer, não foi ingratidão, peço perdão e sintam-se reconhecidos. Muito obrigado de coração.

SUMÁRIO

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIACÕES	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE QUADRO	iv
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 PRODUTOS QUÍMICOS NA AQUICULTURA	7
3.3 PERMANGANATO DE POTÁSSIO NA AQUICULTURA	10
3.3.1 <i>Uso profilático</i>	10
3.3.2 <i>Algicida</i>	11
3.3.3 <i>Toxicidade do permanganato de potássio em peixes</i>	12
3.4 ORGANISMOS-TESTE	15
3.4.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	15
3.4.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	15
3.4.3 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	16
3.5 BIOMARCADORES	17
3.5.1 <i>Hematologia</i>	17
3.5.2 <i>Imunologia</i>	18
3.5.3 <i>Estresse oxidativo e defesa antioxidante</i>	21
3.5.4 <i>Teste do micronúcleo</i>	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS TESTES	29
4.2 VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	29
4.3 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA	29
4.3.1 <i>Aclimação e substância química-teste</i>	29
4.4 TESTE PRELIMINAR	30
4.5 TESTE DEFINITIVO	31
4.7 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA	31
4.7.1 <i>Avaliação hematológica</i>	32
4.7.2 <i>Teste de micronúcleo</i>	33
4.7.3 <i>Atividade fagocítica de macrófago in vivo</i>	34
4.7.4 <i>Análises bioquímicas</i>	35
4.7.4.1 <i>Determinação da concentração de proteína total</i>	35
4.7.4.2 <i>Atividade enzimática da glutathiona S-transferase (GST)</i>	36
4.7.4.3 <i>Concentração de glutathiona reduzida (GSH)</i>	36
4.7.4.4 <i>Atividade enzimática da catalase (CAT)</i>	37
4.7.4.5 <i>Peroxidação lipídica (LPO)</i>	37
4.8 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	38

4.8.1 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	38
4.8.2 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	40
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	44
6.2 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA	49
6.2.1 <i>Variáveis físicas e químicas da água</i>	49
6.2.2 <i>Avaliações hematológicas</i>	50
6.2.3 <i>Atividade fagocítica de macrófagos</i>	54
6.2.4 <i>Análises bioquímicas</i>	56
6.2.5. <i>Avaliação genotóxica</i>	61
6.3 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	65
6.3.1 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	65
6.3.2 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	67
7 CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS	72

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIÇÕES

BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine serum albumin</i>)
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CE	Concentração efetiva
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CF	Capacidade fagocítica
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular media
CI50	Concentração de inibição média
CL50	Concentração letal média
DTNB	Ácido 5,5' - ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>)
EROs	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FOX	do inglês <i>Ferrous oxidation/ Xylenol orange method</i>
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IF	Índice fagocítico
KMnO ₄	Permanganato de potássio
LPO	Peroxidação lipídica (do inglês <i>Lipid peroxidation</i>)
MnO ₂	Dióxido de manganês
MnO ₄ ⁻	Íon permanganato
O ^{•-}	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
TCA	Tricloroacético
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Bateria de teste de toxicidade aguda (CL50;96h) com alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas ao permanganato de potássio..... 30
- Figura 2** – Jovem de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizada no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio. 31
- Figura 3** - Estrutura dos tanques utilizados no experimento de toxicidade crônica com permanganato de potássio. 32
- Figura 4** - Coleta de sangue por punção caudal em jovem de tilápia, *Oreochromis niloticus*, para análise das variáveis hematológicas e teste de micronúcleo, no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio. 33
- Figura 5** - Realização da avaliação de fagocitose em tilápia, *Oreochromis niloticus*, no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio; (a) injeção intraperitoneal de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*; (b) peixes mantidos em aquários durante o período de incubação de 4 horas; (c) realização do lavado na cavidade celomática. 35
- Figura 6** - Vista do experimento com *Ceriodaphnia dubia*, como organismo-teste, expostas ao permanganato de potássio. 39
- Figura 7** - Diferentes fases da curva de crescimento algáceo em sistema de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA 2001). 41
- Figura 8** - Procedimentos realizados no ensaio de inibição de crescimento algal com *Pseudochirneriella subcapitata*, como organismo-teste, expostas ao permanganato de potássio. 42
- Figura 9** - (a) Bateria de teste demonstrando a cor inicial do permanganato de potássio; (b) Cor do reagente após 24 h de exposição indicando sua oxidação no teste de toxicidade aguda com alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. 45
- Figura 10** – Médias e erro padrão das médias dos parâmetros sanguíneos no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio; * diferença significativa ($P < 0,05$); HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; MZ: momento zero. 51
- Figura 11** – Médias e erro padrão das médias da contagem total e diferencial de leucócitos no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio; MZ: momento zero..... 52
- Figura 12** – Médias e erro padrão das médias da contagem total de células sanguíneas no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio. * diferença significativa ($P < 0,05$); MZ: momento zero..... 53
- Figura 13** – Capacidade fagocítica de macrófagos de tilápias, *Oreochromis niloticus*, expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta. * diferença significativa ($P < 0,05$). 55
- Figura 14** - Índice fagocítico de macrófagos de tilápias, *Oreochromis niloticus*, expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta. 56
- Figura 15**- Concentração de glutatona reduzida (GSH) em fígado de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta. * diferença significativa ($P < 0,05$); MZ: momento zero..... 59

Figura 16 - Atividade específica da glutathione S-transferase (GST) em fígado de tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> , expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.....	59
Figura 17 - Atividade específica da catalase (CAT) em fígado de tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> , expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.	60
Figura 18- Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos em fígado de tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> , expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.	60
Figura 19 – Variação das médias de células com micronúcleos em tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> , expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta.	63
Figura 20 - Representação gráfica da toxicidade para <i>Ceriodaphnia dubia</i> nas diferentes diluições de permanganato de potássio a partir da concentração de 4 mg.L ⁻¹	66
Figura 21 - Taxa de crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> exposta a diferentes diluições da concentração 4,0 mg.L ⁻¹ de permanganato de potássio por 72 horas. Média de três ensaios. * diferença significativa (P<0,05).	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Mortalidade média acumulativa (%) em tilápia, *Oreochromis niloticus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda com permanganato de potássio. 44
- Tabela 2** - Valores médios das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda com *Oreochromis niloticus* exposta ao permanganato de potássio. 48
- Tabela 3**- Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica com *Oreochromis niloticus* exposta ao permanganato de potássio. 49
- Tabela 4** - Mortalidade acumulativa de *Ceriodaphnia dubia* ao final de sete dias de exposição a diluições da concentração 4,0 mg.L⁻¹ de permanganato de potássio. 65

LISTA DE QUADRO

- Quadro 1** - Valores de CL50;96h para o permanganato de potássio em diferentes espécies de peixes..... 47

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial tóxico do permanganato de potássio (KMnO_4) através da avaliação da toxicidade aguda ($\text{CL}_{50};96 \text{ h}$) e crônica para a tilápia, *Oreochromis niloticus* e a ecotoxicidade desse composto através de ensaios com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para o teste de toxicidade aguda foram utilizados alevinos de tilápia ($0,52 \pm 0,10 \text{ g}$ e $3,35 \pm 0,36 \text{ cm}$), expostos a seguintes concentrações: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e $6,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$. Os efeitos subletais do KMnO_4 foram avaliados pelo teste de toxicidade crônica, com um grupo controle e duas concentrações-teste, utilizadas na aquicultura para o manejo e controle de doenças ($1,0$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$). Para este teste foram utilizadas tilápias (40 g) jovens, expostas por 30 dias, com amostragem de 10 indivíduos por tratamento, nos intervalos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os biomarcadores avaliados no presente estudo foram: análises hematológicas, da atividade fagocítica, determinações da concentração de GSH, da atividade enzimática da GST, catalase e peroxidação lipídica e genotóxicas. No teste de toxicidade aguda, o baixo valor de $\text{CL}_{50};96 \text{ h}$ ($1,81 \text{ mg.L}^{-1}$), sugere que esta espécie de peixe, nesta fase de desenvolvimento, apresenta grande sensibilidade ao composto. No teste de toxicidade crônica, os peixes expostos na concentração de 1 mg.L^{-1} de KMnO_4 não apresentaram variações significativas nos parâmetros sanguíneos analisados quando comparados ao grupo controle. Na concentração de 4 mg.L^{-1} , as alterações no quadro hematológico indicaram processo de hemólise e redução da atividade fagocítica em consequência da ação oxidante do KMnO_4 . Nas concentrações de 1 e $4 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$ houve redução significativa da capacidade fagocítica de macrófagos. Na análise bioquímica, somente a enzima GSH apresentou aumento significativo nos peixes das duas concentrações testadas, indicando resposta adaptativa e de proteção contra o estresse oxidativo. A contagem de micronúcleos indicou não ser um biomarcador adequado para detectar a ação genotóxica do KMnO_4 , uma vez que, a redução no número de eritrócitos causada pelo composto pode ter mascarado a frequência de micronúcleos. Os ensaios ecotoxicológicos com *C. dubia* e com a microalga *P. subcapitata*, mostraram que o KMnO_4 causou toxicidade em quase todas as concentrações testadas, com exceção apenas para a menor concentração de 3,1% ($0,12 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$). Tais resultados indicam que este poluente pode agir negativamente sobre diferentes níveis tróficos.

Palavras-chave: permanganato de potássio, toxicidade, *Oreochromis niloticus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia*

ABSTRACT

This study aimed to know the toxic potential of the potassium permanganate (KMnO_4) through the evaluation of the acute ($\text{LC}_{50;96\text{h}}$) and chronic toxicity to tilapia, *Oreochromis niloticus* and the ecotoxicity of this compound through the assays with the microcrustacean *Ceriodaphnia dubia* and with microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. For the acute toxicity test were used tilapia fingerlings ($0.52 \pm 0.10\text{g}$ and $3.35 \pm 0.36\text{ cm}$), exposed to concentrations: 0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and $6.0\text{ mg.L}^{-1}\text{ KMnO}_4$. The sublethal effects of the KMnO_4 were evaluated through chronic toxicity test, with a control group and two test concentrations, used in the aquaculture to management and control fishes diseases (1.0 and $4.0\text{ mg.L}^{-1}\text{ KMnO}_4$). To this experiment were used with juvenile tilapia (40 g), exposed for 30 days, with samples of 10 individuals from each treatment at intervals of 0, 7, 15 and 30- days. The biomarkers evaluated in this present study were: hematological analysis, phagocytic activity, determination of GSH concentration, of enzymatic activity of GST, catalase, lipid peroxidation and genotoxicities. In the acute toxicity test, the low value of $\text{LC}_{50;96\text{h}}$ (1.81 mg.L^{-1}), suggests that this species of fish, in this phase of development, it presents the great sensitivity to the KMnO_4 . In the chronic toxicity test, the fishes exposed in the concentrations of 1 mg.L^{-1} de KMnO_4 did not present significant variations in the analyzed sanguineous parameters when compared with the control group. In concentration of 4 mg.L^{-1} the hematological alterations indicated process of hemolysis and immunosuppression in consequence of the oxidant action of KMnO_4 . In the immunologicals analysis, the concentrations of 1 and $4\text{ mg.L}^{-1}\text{ KMnO}_4$ had significant reduction of the fagocitic capacity of the fishes suggesting suppression of the immune system. In the analysis biochemical, only the enzyme GSH presented significant increase in the fishes of the two tested concentrations, indicating adaptative reply and of protection against oxidative stress. The counting of micronucleus indicated not to be an adjusted biomarker to detect the genotoxic action of the KMnO_4 , a time that, the reduction in the number of erythrocytes caused by chemical component can have masked the frequency of micronucleus. The ecotoxicological assays with *C. dubia* and microalgae *P. subcapitata*, shown that the KMnO_4 caused toxicity in almost all the tested concentrations, with exception only for the lesser concentration of 3.1% ($0.12\text{ mg.L}^{-1}\text{ KMnO}_4$). These results indicate that this pollutant can act negatively on different trophic levels.

Key words: potassium permanganate, toxicity, *Oreochromis niloticus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia*

1 INTRODUÇÃO

A intensificação da aquicultura pode acarretar o aparecimento de enfermidades aos peixes, devido ao estresse causado pelas condições de confinamento. A consequência disso é o uso indiscriminado de diversos produtos químicos para o controle de enfermidades, sem conhecimento dos prejuízos que isso pode acarretar ao ambiente.

A dificuldade encontrada para realizar algum tipo de tratamento é não saber exatamente a eficiência dos produtos, além de não haver, na maioria das vezes, comprovação científica de sua eficácia, não sendo possível prever a extensão do prejuízo que estes produtos podem causar quando liberados no ambiente (PAVANELLI *et al.*, 2002).

De acordo com MARTINS (2004), o ideal seria que o produto químico utilizado na aquicultura apresentasse as seguintes características como ausência de danos ao tecido animal, ter degradação rápida, não deixar resíduo na água, no substrato ou no tecido do animal, não interferir na qualidade da água, não oferecer perigo aos humanos e animais, baixo custo e fácil aplicação. Contudo, sabe-se que a maioria dos produtos utilizados para este fim são altamente tóxicos se administrados de maneira incorreta ou indiscriminada, havendo, portanto, a necessidade de estudos para comprovação da eficácia dos medicamentos utilizados na profilaxia validem o desenvolvimento e a sobrevivência dos peixes após o tratamento.

O permanganato de potássio está entre os produtos químicos mais utilizados na aquicultura (GRIFFIN *et al.*, 2002), sendo usado principalmente como desinfetante em aquários e tanques, na remoção de parasitos como *Ichthyophthirius multifiliis* (STRAUS e GRIFFIN, 2002), monogenéticos como *Pseudodactylogyrus anguillae* e *Pseudodactylogyrus bini* (UMEDA *et al.*, 2006) e também para o controle de fungos e bactérias (SCHELENK *et al.*, 2000). Por outro lado, trata-se de um produto com alto grau de toxicidade para os peixes por ser um forte oxidante, podendo causar danos em tecidos delicados como pele e brânquias, dependendo da concentração utilizada (DARWISH *et al.*, 2002).

No Brasil, são poucos os trabalhos que testam a eficácia do permanganato de potássio e mais raros ainda, os que avaliam o seu efeito secundário nos peixes. Neste contexto, destacam-se os de ANDRADE *et al.* (2005), com *Poecilia reticulata*, CARNEIRO *et al.* (2005), com *Rhamdia quelen* e KLEIN *et al.* (2004), com *Steindachneridion* sp. Com relação ao estudo do efeito tóxico, citam-se CRUZ *et al.* (2006), com *Phallocerus caudimaculatus* e SILVA *et al.* (2006), com *Colossoma macropomum*.

Para efeito de monitoramento de um corpo de água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes mais utilizados são os de avaliação das toxicidades aguda e crônica. Segundo LOMBARDI (2004), os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre os organismos aquáticos. Os testes de toxicidade aguda caracterizam-se pelo curto tempo de exposição (24 a 96 horas) a concentrações geralmente elevadas de determinada substância química; os critérios avaliados são mortalidade, imobilidade ou crescimento, utilizando-se geralmente a concentração letal Média (CL50), a concentração efetiva média (CE50), ou a concentração de inibição média (CI50) (RAND e PETROCELLI, 1985).

Nos testes de toxicidade crônica o tempo de exposição envolve períodos mais longos com concentrações sub-letais, no qual se avaliam os parâmetros de comportamento, as alterações fisiológicas e morfológicas, utilizando-se, geralmente, a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). Assim, o impacto dos poluentes sobre os organismos aquáticos pode ser estimado e monitorado por testes de toxicidade em condições de laboratório (RAND e PETROCELLI, 1985).

Estes estudos são realizados com a utilização de organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, especialmente aqueles cultiváveis em laboratório, tais como microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), microcrustáceos cladóceros (*Daphnia similis* ou *Ceriodaphnia dubia*) e peixes, sendo que a escolha dos organismos-teste para a realização

destes ensaios deve considerar diversos critérios baseados na resposta que se pretende obter (LOMBARDI, 2004).

As algas estão entre os organismos mais recomendados para ensaios de avaliação da toxicidade aquática. Além de serem produtores primários na cadeia alimentar no ambiente aquático, apresentam rápida resposta fisiológica, devido ao seu ciclo de vida curto, facilitando os estudos de exposição com várias gerações e, dessa forma, os efeitos provocados por substâncias tóxicas podem ser detectados num curto espaço de tempo (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Os microcrustáceos também são organismos muito utilizados nos testes de toxicidade, pois desempenham um papel importante na cadeia alimentar, nutrindo-se de algas e servem de alimento para consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Assim, mudanças na população e no comportamento destes organismos podem interferir em outros níveis tróficos do ecossistema aquático (CETESB, 2002).

Os bioensaios com peixes permitem estudar, sob condições controladas, algumas variáveis como mortalidade, alterações comportamentais e danos nos tecidos ou células, podendo ajudar a prever alguns efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos naturais (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 1996). Assim, o uso de variáveis bioquímicas, fisiológicas e morfológicas como biomarcadores têm apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes (MARTINEZ e SOUZA, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo analisar o efeito tóxico do permanganato de potássio (KMnO_4) em tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Avaliar a ecotoxicidade do permanganato de potássio por meio de ensaios com o microcrustáceo (*Ceriodaphnia dubia*) e com a microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

2.2. Objetivos específicos

Determinar a concentração letal média $\text{CL}_{50;96\text{h}}$ do permanganato de potássio, utilizando alevinos de tilápia, *O. niloticus*, como organismo-teste;

Avaliar o efeito sub-letal do permanganato de potássio, para a tilápia, *O. niloticus*, usando como biomarcadores as análises hematológicas, capacidade fagocítica, de estresse oxidativo e de genotoxicidade;

Avaliar a toxicidade do permanganato de potássio sobre o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* por meio de mortalidade e efeito sobre a reprodução;

Avaliar a toxicidade do permanganato de potássio sobre a alga *Pseudochirchiriniela subcaptata* por meio de inibição da taxa de crescimento algal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos químicos na aquicultura

O sucesso da piscicultura está relacionado diretamente com a possibilidade de se criar o maior estoque possível, no menor volume de água, levando-se em consideração as condições sanitárias dos organismos produzidos. No entanto, toda grande concentração de animais favorece o aparecimento de doenças. Em regime de confinamento, não somente a alta densidade, mas também fatores como a baixa qualidade da água, manejo inadequado, excesso de alimentos contribui para o aparecimento de surtos epizooticos, condições estas que facilitam a transmissão de agentes patogênicos. Isso ocorre porque os peixes tornam-se mais sensíveis e menos resistentes às infecções, devido ao fato de serem submetidos a um estresse crônico com reflexo em sua homeostasia que fica limitada (PAVANELLI *et al.*, 2002).

O manejo sanitário e profilático são medidas importantes para evitar as enfermidades. No manejo adequado, alguns procedimentos como quarentena; estratégia alimentar adequada à espécie; técnicas de aeração; limpeza e assepsia; técnicas que reduzam a concentração de matéria orgânica e evitem a fuga de animais que eventualmente possam estar parasitados, são imprescindíveis para uma aquicultura sustentável (MARTINS, 2004).

Para prevenir e controlar o desenvolvimento e a proliferação de agentes patógenos, os criadores têm utilizado produtos químicos, de forma indiscriminada, sem ter conhecimento de sua eficácia e dos prejuízos que isso pode acarretar ao ambiente. Dentre os principais produtos utilizados para o controle sanitário destacam-se: o cloreto de sódio, permanganato de potássio, formaldeído, os organofosforados triclorfon, e os antibióticos, tetraciclina, eritromicina e a oxitetraciclina (MAXIMIANO *et al.*, 2005).

Os organofosforados são amplamente utilizados como tratamento para o controle de ectoparasitos em peixes. Porém, a aplicação destes produtos pode causar alterações fisiológicas aos organismos expostos. De acordo com RANZANI-PAIVA *et al.* (1997), a

exposição ao triclorfon ($0,2 \mu\text{L.L}^{-1}$), em *Prochilodus lineatus* acarretou intoxicação, com redução na porcentagem de linfócitos e aumento na de neutrófilos. A aplicação destes produtos pode resultar ainda em altos níveis de resíduos nos peixes de consumo, principalmente se os períodos de carência não forem respeitados pelos piscicultores (RODRIGUES *et al.*, 1997). Além disso, tais produtos podem causar diversos impactos em outros organismos não alvos do ambiente e na água retirada de cursos d'água para outros fins.

O uso profilático de antibióticos na aquicultura tem-se tornado comum, pois no Brasil, não há legislação que regulamente o uso de medicamentos veterinários na aquicultura, o que facilita ainda mais o uso indiscriminado. O mau uso dos antibióticos favorece a seleção de microorganismos resistentes, a transferência de genes de resistência para bactérias potencialmente patogênicas e alteração da microbiota no sistema de cultivo (HÖLMSTROM *et al.*, 2003). Além disso, o potencial dos sistemas de cultivo, em relação à capacidade de abrigar bactérias resistentes a antibióticos e favorecer a seleção e disseminação de genes de resistência, ainda não está bem estabelecido (CARNEIRO *et al.*, 2007). Deste modo, é importante que esse uso seja limitado, a fim de minimizar a propagação de resistência ao medicamento em bactérias patogênicas, além de evitar produtos destinados ao consumidor com a presença de resíduos.

O cloreto de sódio (NaCl), o permanganato de potássio (KMnO_4), a formalina e o azul de metileno estão entre os produtos mais utilizados em banhos para a profilaxia de peixes (ANDRADE *et al.*, 2005). No entanto, a maioria destes produtos ainda não tem sua eficácia totalmente comprovada e nem os seus efeitos secundários aos organismos não-alvo estabelecidos. Além disso, nem sempre as formulações indicadas para uma determinada espécie terão o mesmo resultado, uma vez que diferentes cepas de microorganismos podem apresentar maior sensibilidade que outras. Exemplo disso, foi registrado em estudos realizados

por CARNEIRO *et al.* (2005), para formalina e por KLEIN *et al.* (2004), para o permanganato de potássio.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração são os fatores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas, os quais interagem modificando a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Os fatores bióticos podem influenciar a resposta ao agente tóxico de modo que organismos possam ter maior ou menor sensibilidade. Estes fatores incluem o tipo de organismo ou grupo taxonômico (peixe, anfíbio, alga, etc.), idade ou estágio de desenvolvimento (ovo, larva, adulto), tamanho, entre outros. Já os fatores abióticos que podem alterar a toxicidade, incluem as características físicas e químicas do meio aquático, tais como temperatura, pH, alcalinidade, salinidade, dureza, teor de oxigênio dissolvido, matéria orgânica e material particulado em suspensão, entre outros (WRIGHT e WELBOURN, 2002).

Contudo, muitos aspectos da dinâmica do uso de quimioterápicos na aquicultura ainda devem ser estudados. Os vários aspectos do uso de drogas para o controle de doenças tais como suas dosagens, intervalos da administração, duração da exposição dos peixes, seu efeito e eficácia no controle da doença, período da retirada dos tecidos, efeitos em espécies não-alvo, precisam ser claramente compreendidos.

O uso indiscriminado de tais substâncias pode trazer sérios danos à saúde pública e à vida aquática. O problema mais sério neste momento é a falta de informação sobre o seu uso. A maior parte dos produtos químicos e de biocidas veterinários está livremente disponível ao consumidor. Frequentemente, os produtores desconhecem a natureza das doenças e sua etiologia, e aceitam facilmente em conselhos de agentes não capacitados. Isto conduz ao uso indiscriminado de produtos químicos perigosos. Portanto, torna-se necessário conscientizar os aquicultores dos perigos potenciais do uso indiscriminado de drogas.

3.3 Permanganato de potássio na aquicultura

3.3.1 Uso profilático

O permanganato de potássio é um agente oxidante usado há muitos anos na aquicultura para tratamento e ou prevenção de doenças de peixes, na remoção de parasitos, como desinfetante em tanques de criação de peixes e aquários, na redução de substâncias tóxicas ao peixe como rotenona e a antimicina, no controle de fungos e algas para controlar problemas temporários de redução de oxigênio em tanques (DUNCAN, 1974).

Segundo FRANCIS-FLOYD e KLINGER (1997), o uso correto do permanganato de potássio pode controlar eficientemente muitos agentes bacterianos, parasitos e fungos antes mesmo que as infecções sejam estabelecidas no peixe, eliminando deste modo, a necessidade de tratamento por antibióticos.

O uso de permanganato de potássio para a realização de banhos profiláticos em alevinos e adultos adquiridos para a criação, reprodução e venda é recomendada como medida profilática rotineira. De acordo com PAVANELLI *et al.* (2002), recomenda-se diluir 1 g de KMnO_4 em 50 L de água e colocar os peixes durante uma hora. STRAUS e GRIFFIN (2002), verificaram que baixa concentração de permanganato de potássio ($1,25 \text{ mg.L}^{-1}$) foi eficaz no controle de *Ichthyophthirius multifiliis* em *Ictalurus punctatus*.

O permanganato de potássio é usado também no controle de bactérias como *Flexibacter maritimus*, inibindo em até 100% a ação desses organismos (DANAYADOL *et al.*, 1999). THOMAS-JINU e GOODWIN (2004) observaram que o tratamento com permanganato de potássio em *Ictalurus punctatus* infectados experimentalmente com *Flavobacterium columnari* reduziu a mortalidade de 100 para 69% pela infecção aguda causada pela bactéria. Segundo MARTINS (1997), a proliferação de *Flexibacter columnaris* pode ser evitada através da realização de banho preventivo no peixe de aproximadamente 5 a 20 minutos em solução de sal (NaCl) a 1% juntamente com 10 mg de permanganato de potássio por litro de água.

O uso do permanganato de potássio é recomendado no controle de parasitos como monogenéticos. CRESPO *et al.* (1995), constataram que permanganato de potássio foi altamente eficiente no controle da infestação por *Ciclidogyrus* em *Oreochromis hornorum*. Em experimentos realizados no Centro de Aquicultura da UNESP, observou-se que três aplicações de 2 mg de KMnO_4 por litro de água em tanques de 50 m³ diminuiu consideravelmente a quantidade de monogenéticos nas brânquias de pacus (MARTINS, 1997). O permanganato de potássio foi eficaz no combate de oncomiracídeos de *Pseudodactylogyrus*, após cinco horas de exposição a uma concentração de 2 a 20 mg.L⁻¹. A eficiência desse tratamento foi maior do que o uso de triclorfon, azul de metileno e cloreto de sódio (UMEDA *et al.*, 2006).

PAVANELLI *et al.* (2002), recomendam o uso de permanganato de potássio no controle de saprolegniose, doença provocada por fungos do gênero *Saprolegnia*, com banhos de 5 a 10 minutos numa concentração de 1:10.000.

Devido a sua forte ação oxidante, o permanganato de potássio é usado na desintoxicação de produtos tóxicos aos peixes, tais como a rotenona e a antimicina. LAWRENCE (1956) demonstrou que o uso sucessivo de permanganato de potássio na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ neutralizou a toxicidade da rotenona em aquários. Em tanques e lagos, a concentração de KMnO_4 variou entre 2,0 a 2,5 mg.L⁻¹ para neutralizar 0,5 mg.L⁻¹ de rotenona. MARKING e BILLS (1975), mostraram que pequenas concentrações de antimicina podem ser neutralizadas com 1,0 mg.L⁻¹ de permanganato de potássio.

3.3.2 Algicida

Um problema comum enfrentado na aquicultura é o crescimento excessivo do fitoplâncton (algas verdes, diatomáceas e cianofíceas), em virtude da adubação com fertilizantes nos tanques e o excesso de nutrientes provenientes da ração, que favorece o fenômeno chamado floração ou *bloom* (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000), tendo como

consequência, a mortalidade em massa dos peixes causando expressivos impactos econômicos. Além disso, em viveiros onde há predomínio de cianofíceas, os peixes podem apresentar alterações organolépticas conhecido como “off-flavour” (sabor de barro), com consequente rejeição por parte dos consumidores pelo sabor inaceitável do alimento.

De acordo com SMITH (2005), vários produtos são utilizados para o controle dessas algas, sendo o sulfato de amônio e o sulfato de cobre frequentemente os mais recomendados. Contudo, a aplicação do sulfato de amônio aumenta o nível de amônia nos tanques, já o sulfato de cobre, provoca a morte das algas por lise celular com a subsequente liberação de seus compostos tóxicos, além de promover condições anóxicas na água devido à decomposição das algas mortas.

Deste modo, a utilização do permanganato de potássio para o controle de algas citotóxicas vem sendo estudada. DORZAB e BARKOH (2005), comparando os efeitos do permanganato de potássio e do sulfato de cobre, observaram que o tratamento com 4 mg.L^{-1} de permanganato de potássio durante três dias foi eficaz na erradicação de algas do gênero *Prymnesium parvum* e na neutralização da sua ictiotoxina em tanques com truta arco-íris. De acordo com DEEDS *et al.* (2002), a espécie de alga *Karlodinium micrum* pertencente ao grupo Dinophyceae, produz pelo menos uma substância que é hemolítica, ictiotóxica e citotóxica. Estes autores observaram que tanto o tratamento com sulfato de cobre (CuSO_4), quanto com permanganato de potássio (KMnO_4) causaram significativa lise em células de *K. micrum* (> 70%), porém as substâncias tóxicas destas algas foram liberadas em grandes quantidades após o tratamento com cobre, já com o permanganato de potássio nenhum efeito tóxico subsequente foi observado.

3.3.3 Toxicidade do permanganato de potássio em peixes

O permanganato de potássio é oxidante para qualquer material orgânico, sendo o íon MnO_4^- o responsável por esta ação. O KMnO_4 também forma dióxido de manganês, o qual

tem uma capa externa de grupos oxidrilas capazes de fixar, por absorção, partículas neutras ou carregadas, incluindo microorganismos que são fixados ao precipitado coloidal para serem desativados (USEPA, 1999).

A presença do permanganato de potássio na água em sua forma ativa (não oxidada) apresenta coloração variando de rosa a roxo, dependendo de sua concentração. Porém, quando o produto torna-se inativo, após oxidar o material orgânico, a cor da água muda de amarelo ao marrom (FRANCIS-FLOYD e KLINGER, 1997), devido a formação do dióxido de manganês (MnO_2), como produto da redução do $KMnO_4$ (STRAUS e GRIFFIN, 2002), como descrito na equação 1. Esta mudança de cor é importante para controle durante o tratamento químico.



Embora o permanganato de potássio seja amplamente empregado na prevenção e tratamento de doenças em peixes, as concentrações recomendadas do composto nem sempre são seguras. Dependendo da concentração usada, torna-se tóxico, podendo causar lesões em tecidos como pele e brânquias, principalmente, se as concentrações forem acima das recomendadas para tratamento. INTORRE *et al.* (2007), observaram que a exposição ao permanganato de potássio, em concentrações terapêuticas, resultou em efeito tóxico para o *Danio rerio*, e nenhum efeito para *Carassius auratus*. Os mesmos autores observaram ainda, que concentrações cinco vezes maiores que a recomendada foram mais tóxicas do que a formalina e o cloreto de benzalcônio para *Danio rerio*. Em *Ictalurus punctatus* expostos a concentrações três a cinco vezes maiores que a recomendada de permanganato de potássio provocou nas brânquias, hiperplasia, hipertrofia epitelial e necroses, fusão lamelar, infiltração de leucócitos, obstrução do espaço interlamelar (DARWISH *et al.*, 2002).

O permanganato de potássio também pode causar toxicidade em ovos de peixes quando utilizado para combater fungos. MELENDRE *et al.*, (2006) observaram que concentrações de 100 e 150 mg.L⁻¹ de $KMnO_4$ controlaram os fungos, mas foram tóxicos para

os ovos de *Pacifastacus leniusculus*. Em ovos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), concentrações de 50 e 100 ppm de KMnO_4 , além de não controlar a infecção por fungos, causou atraso na eclosão dos ovos (MARKING *et al.*, 1994). LIU *et al.* (1995) registraram que doses de 25 e 75 ppm reduziram a taxa de eclosão dos ovos, e em baixas concentrações não foram eficazes no controle dos fungos.

Informações sobre as alterações fisiológicas nos peixes por exposição aguda e subcrônica ao KMnO_4 são limitadas. No entanto, estudos realizados por GRIFFIN *et al.* (2002), em *Ictalurus punctatus*, revelaram que indicadores de estresse (cortisol plasmático, glicemia, concentração de cloreto e osmolaridade) foram modificados quando o peixe foi exposto à concentração de $2,19 \text{ mg.L}^{-1}$ de permanganato de potássio por 36 horas. SILVA *et al.* (2006) observaram aumento significativo da glicemia, concentrações de cloreto e sódio no plasma, em *Colossoma macropomum* expostos a $4,30 \text{ mg.L}^{-1}$. Isto sugere distúrbio no balanço iônico de ambas as espécies causadas pelo composto. Em brânquias de *Ictalurus punctatus*, proteínas como as metalotioneínas, cuja função está relacionada à detoxificação de metais pesados e proteção contra estresse oxidativo, tiveram sua expressão gênica reduzida após oito semanas de exposição à $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de KMnO_4 (SCHLENK *et al.*, 2000).

A toxicidade do permanganato de potássio em peixes pode ser influenciada pela qualidade da água, especialmente pela temperatura, pH e dureza. De acordo com MARKING e BILLS (1975), a água com dureza e alcalinidade elevada e baixa temperatura aumentaram a toxicidade do permanganato de potássio em peixes. Por outro lado, STRAUS (2004) observou que a toxicidade do composto nos peixes foi reduzida em água com baixa dureza e alcalinidade.

3.4 Organismos-teste

3.4.1 *Oreochromis niloticus*

Os peixes são ecologicamente e economicamente importantes. Eles representam o grupo de vertebrados com diversos comportamentos e estratégias reprodutivas, e desempenham papel importante na cadeia alimentar como predadores e presas. Embora, nem sempre sejam considerados os organismos aquáticos mais sensíveis aos estressores químicos, possuem ampla variação de comportamento e habitats, que aumentam seu potencial para a exposição à substâncias químicas em diferentes matrizes ambientais (por exemplo: dissolvidos, adsorvidos, suspensos e depositados). Além disso, existe extensa literatura sobre seu comportamento, fisiologia e requerimentos ambientais, que os tornam relevantes como grupo de organismos testes para avaliar os efeitos biológicos de substâncias químicas tóxicas (RAND, 2008).

A tilápia é bastante criada no Brasil, por apresentar bom valor econômico. A alta qualidade de sua carne faz dela um produto de interesse industrial e de boa aceitação pelo mercado consumidor (CASTAGNOLLI, 1992). Atualmente é explorada em 22 Estados do Brasil, exceção feita apenas para alguns Estados da Região Norte (OSTRENSKY *et al.*, 2000).

3.4.2 *Ceriodaphnia dubia*

Os organismos zooplanctônicos são sensíveis bioindicadores e amplamente utilizados em estudos de ecotoxicologia de água doce (RODGHER *et al.*, 2009). *C. dubia* é um microcrustáceo (Ordem Cladocera) presente em diferentes ecossistemas aquáticos de água doce. Esta espécie faz parte do zooplâncton e sua reprodução acontece por partenogênese, favorecendo a produção de lotes uniformes geneticamente, numerosos e homogêneos. Esta espécie é utilizada em avaliações da qualidade de águas superficiais e efluentes (TAKENAKA *et al.*, 2007; ROMANELLI *et al.*, 2006; MARRARA e SIVIERO, 2006).

3.4.3 *Pseudokirchneriella subcapitata*

Testes ecotoxicológicos baseados sob pequena escala ou bioensaios *in vitro* tem melhorado a habilidade para o monitoramento da qualidade da água. O uso destes métodos, os quais são tipicamente baseados em componentes celulares, células, órgãos ou pequenos animais, são altamente sensíveis, de rápida reprodução e requerem pequenas quantidades amostrais (LATIF e LICEK, 2003). Além disso, têm a vantagem de poder integrar a atividade toxicológica de múltiplos contaminantes que atuam por meio de um mecanismo comum, sendo possível avaliar o potencial efeito tóxico em amostras biológicas complexas. (KALLQUIST *et al.*, 2008). Deste modo, os ensaios de toxicidade são incluídos em programas de controle de poluição, sendo uma das análises indispensáveis (CETESB, 1990).

Um dos testes mais comuns para a avaliação da toxicidade aquática é o teste de inibição do crescimento algal (ISO, 2004). O uso de algas é dos mais recomendados, pois, como espécies representativas do nível trófico inferior, são ecologicamente importantes, porque servem como fonte de alimento fundamental para outras espécies aquáticas e ocupam posição única entre os produtores primários, sendo elo importante na cadeia alimentar (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

A utilidade das algas como organismos testes tem por base seu ciclo de vida curto, facilitando os estudos de exposição com várias gerações, além das altas taxas de crescimento, da facilidade em manter culturas e da capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. Desde a origem dos bioensaios com algas, grandes avanços ocorreram no desenvolvimento de meios de cultura apropriados, de métodos de isolamento e cultura das espécies, bem como na elaboração de modelos. Os ensaios com algas fornecem informações quantitativas sobre a disponibilidade das substâncias químicas, nutrientes ou substâncias potencialmente tóxicas e seus efeitos nos ecossistemas. Esses estudos abrem possibilidade de combinação de medidas físicas, químicas e biológicas, que resulta em informações importantes. A partir de testes de toxicidade com algas, foi sugerido que, as substâncias

químicas fossem classificadas quanto à sua toxicidade ambiental, auxiliando na avaliação do risco ambiental para os sistemas naturais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Em contraste com peixes e invertebrados, o número de ensaios com microalgas *in situ* é limitado, mesmo que tenham uma clara justificativa com relação à proteção ambiental (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2004). A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente denominada como *Selenastrum capricornutum* e *Rhapidocelis subcapitata*) está entre as espécies mais recomendadas em teste de toxicidade de água-doce (USEPA, 1994). Comparado com os testes de toxicidade aguda e crônica com outras espécies aquáticas, tais como, peixes e crustáceos, os testes com algas frequentemente são os mais sensíveis (KALLQUIST *et al.*, 2008).

3.5 Biomarcadores

3.5.1 Hematologia

Os parâmetros do sangue são considerados indicadores fisiohistopatológicos do corpo inteiro e conseqüentemente é um importante diagnóstico do status estrutural e funcional do peixe exposto à substância tóxica. (ADHIKARI *et al.*, 2004). Por se encontrarem em contato direto com o ambiente, os peixes são susceptíveis a qualquer alteração que nele ocorra. Estas alterações afetam, particularmente, os parâmetros hematológicos destes animais (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004). DICK e DIXON (1985) sugerem que a quantidade dos diferentes tipos de células sanguíneas circulantes constituem parâmetro importante para a detecção e a avaliação dos efeitos subletais de substâncias tóxicas.

A utilização das análises de sangue na aquicultura mostra-se promissora, uma vez que expressam correlação com a qualidade da água, doenças infecciosas e exposição a poluentes (CHEN *et al.*, 2003). Alguns autores observaram mudanças no perfil hematológico de peixes expostos à agentes químicos usados na aquicultura (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997; TAVARES-DIAS *et al.*, 2002; MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

3.5.2 Imunologia

Várias condições estressantes na aquicultura, como a alta densidade, manejo e o tratamento de doenças com a utilização de drogas, são conhecidos por comprometerem o mecanismo de defesa dos peixes, devido a alterações na resposta imune (SARDER *et al.*, 2001).

O sistema imune está integrado dentro do organismo e interage intimamente com o funcionamento de muitos órgãos sendo extremamente vulnerável aos danos causados por xenobióticos. Embora, as mudanças ocorridas no sistema imune sejam rapidamente expressas em significativa morbidade e mortalidade dos organismos envolvidos, elas são muitas vezes precedidas por mudanças sutis em alguns componentes do sistema imune, podendo desta forma, ser utilizadas como indicadores de imunotoxicidade ou como biomarcadores (FOURNIER, 2000).

O mecanismo de defesa em peixes não é extensivamente estudado como em mamíferos, no entanto, parecem compartilhar de número estrutural e de características funcionais importantes na imunidade (BENANI *et al.*, 1995; O'HALLORAN *et al.*, 1998). Como em todos os vertebrados, os peixes possuem resposta imune celular e humoral, e órgãos centrais, cuja função principal está envolvida na defesa imune. Os peixes e os mamíferos mostram algumas similaridades e diferenças a respeito da função imune. A maioria dos órgãos linfóides presentes em mamíferos também são encontrados nos peixes, a diferença é que os peixes não possuem linfonodos e medula óssea (PRESS e EVENSEN, 1999). Isto pode significar que a sensibilidade das funções do sistema imune frente à contaminação ambiental é similar entre diferentes espécies, podendo prever mais facilmente o impacto ambiental causado por substâncias tóxicas (BOLS *et al.*, 2001).

Em peixes, a imunidade não-específica é considerada a primeira linha de defesa e representa uma parte importante da resposta imune. Dentro da resposta imune inata (não-

específica), a fagocitose é um mecanismo fundamental e geralmente eficiente que fornece ao organismo uma fiscalização contínua contra os invasores sendo responsável pela destruição dos patógenos (SILVA *et al.*, 2002), durante os estágios iniciais de infecções. As células envolvidas no mecanismo de defesa são os linfócitos T, células citotóxicas não específicas, e células fagocíticas. Os granulócitos e macrófagos possuem atividade fagocítica, a qual representa o passo inicial da resposta imune em peixes, e a maior linha de defesa para todos os materiais estranhos, incluindo agentes patogênicos. Durante a fagocitose, os macrófagos aumentam seu consumo de oxigênio bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como íons superóxido ($O^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). Estas espécies reativas de oxigênio desempenham papel importante na atividade microbicida (BENNANI *et al.*, 1995; BASHEERA-JOHN *et al.*, 2002).

A função fagocítica de peixes é aplicada como indicador da qualidade da saúde do peixe. Adicionalmente, a habilidade fagocítica vem sendo empregada para avaliar a ação imunotoxicológica de poluentes ambientais e imunostimulantes usados na aquicultura (HARDFORD *et al.*, 2005).

Os possíveis efeitos do permanganato de potássio sobre o sistema imune em peixes ainda são desconhecidos. No entanto, em estudos ecotoxicológicos reporta-se que até mesmo baixos níveis de poluentes aquáticos podem atuar como agente estressante ambiental e causar alterações imunocompetentes aos organismos presentes (BARIKEL *et al.*, 2005). Diversos produtos químicos são conhecidos por produzir efeitos imunes inibindo ou realçando respostas, porém, nem todos os compostos dentro de uma classe química podem alterar a resposta imune. Determinados compostos como metais pesados, halogenados, hidrocarbonetos, inseticidas e pesticidas organoclorados e organofosforados, entre outros, podem alterar a resposta imune de grande variedade de espécies animais, inclusive seres humanos. O interessante é que, muitos destes mesmos produtos químicos são encontrados

contaminando ambientes aquáticos. Apesar do fato de que os peixes podem ser negativamente impactados por estes produtos químicos, pouco se sabe a respeito de seus efeitos na resposta imune dos peixes (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). Interferências de inseticidas, metais pesados e surfactantes sobre a resposta imune são frequentemente estudadas (BOLS, *et al.*, 2001).

Por meio dos resultados de numerosos estudos, parece claro que o sistema imune é sensível para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas de interesse ambiental (ZELIKOFF *et al.*, 2000). A sofisticação e a complexidade do sistema imune permitem que seja sensível e conseqüentemente, torna possível detectar efeitos prejudiciais de estressores ambientais. A sensibilidade deste sistema parece residir em interações complexas que podem ocorrer para a mobilização de defesas imunes. O rompimento de qualquer destes processos pode deslocar o contrapeso necessário para a imunoregulação do organismo e assim produzir uma cascata de eventos secundários prejudiciais, incluindo a resistência comprometida do organismo de encontro às doenças infecciosas. Devido à sensibilidade da resposta imune aos tóxicos ambientais e a sua importância para manter a resistência do organismo contra doenças, a disfunção do sistema imune induzido por substâncias químicas pode prever os perigos e riscos toxicológicos associados com a exposição aos poluentes (CARLSON e ZELIKOFF, 2008).

Convém, no entanto, salientar que o sistema imunitário pode ser influenciado por grande variedade de estressores, o que implica em que biomarcadores imunológicos podem ser úteis e sensíveis, mas muitas vezes inespecíficos (WEEKS *et al.*, 1992). Portanto, torna-se importante incluir informações da resposta imune com outros indicadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos, pois diversos tipos de biomarcadores podem refletir com maior precisão os efeitos toxicológicos para as espécies residentes em ambientes aquáticos contaminados.

3.5.3 Estresse oxidativo e defesa antioxidante

Os radicais livres são constantemente formados no organismo aeróbico através de processos metabólicos oxidativos, os quais desempenham funções importantes, como por exemplo, a utilização do peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos, no combate a microorganismos invasores (BABIOR, 2000). Por outro lado, os danos oxidativos causados pelos os radicais livres estão associados a uma série de processos fisiopatológicos, como envelhecimento, cardiopatias, aterosclerose, diabetes, inflamação e problemas pulmonares (ANDRADE Jr. *et al.*, 2005; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Os danos no DNA também têm papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN, 2005).

Os principais radicais livres conhecidos são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), e o radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}). No entanto, existem moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio altamente reativas e que não são classificadas como radical livre, pois não apresentam elétrons desemparelhados na última camada. Dentre os quais podemos citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), chamados de espécies reativas do oxigênio (EROs). O termo espécies reativas de oxigênio é um coletivo que inclui não somente radicais de oxigênio como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou hidroxila (OH^{\cdot}), mas, também, espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCL) (HALLIWELL, 1989).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante promove o estresse oxidativo, de modo que os primeiros sejam predominantes. Um dos principais mecanismos de lesão inclui a lipoperoxidação da camada lipídica da membrana celular, danos ao DNA, em proteínas e carboidratos causando diversas alterações estruturais e funcionais na célula (SIES, 1993; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005).

A produção de EROs é uma parte inescapável da vida aeróbica. Os radicais livres são gerados endogenamente em pequenas quantidades como subprodutos do metabolismo do oxigênio e também em situação exógena pela exposição da célula a xenobióticos que causam a redução incompleta do oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A célula para se proteger ou prevenir contra a lesão oxidativa possui um sistema endógeno de defesa antioxidante.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes permitem classificá-los como preventivos e reparadores. Dentre os antioxidantes preventivos estão glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E. Estas enzimas atuam como detoxificadoras do agente oxidante antes que cause lesão. Dentre as enzimas reparadoras estão a glutathiona-reductase (GSH-Rd), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e o ácido ascórbico, cuja função é reparar a lesão ocorrida (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A superóxido dismutase é a primeira linha de defesa na proteção contra as EROs por acelerar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ . Os vertebrados possuem duas formas distintas de SOD: SOD cobre-zinco (CuZnSOD), localizada no citosol, SOD-manganês (MnSOD) presente na mitocôndria. Embora a SOD reduza de modo eficaz a concentração celular do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a desvantagem desta atividade é que um dos produtos gerados é o peróxido de hidrogênio (GIULIO e MEYER, 2008).

No entanto, existem dois sistemas de enzimas que metabolizam o H_2O_2 : a catalase e a glutathiona peroxidase. A catalase está presente em todas as células principalmente nos peroxissomos e desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 promovendo a sua catálise em água e oxigênio molecular (GIULIO e MEYER, 2008). A enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) está presente no citosol, na mitocôndria e na membrana e possui uma característica importante, pois apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio ligado de

forma covalente ao restante da enzima (ARTHUR, 2000). Esta enzima utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como substrato para a eliminação de peróxidos formando glutathiona oxidada (GSSG) e água. Outra enzima que age conjuntamente com a *glutathiona peroxidase* é a enzima *glutathiona redutase* (GSH-Rd). Embora não tenha ação direta na remoção de espécies radicalares, é responsável pela recuperação da glutathiona oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) num processo dependente da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (LU, 1999), tendo como objetivo a manutenção da integridade do ciclo metabólico da glutathiona. Por fim, o sistema glutathiona-S-transferase (GST) que catalisa a conjugação da glutathiona reduzida (GSH) a xenobióticos nucleofílicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), ou para detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica (JORDÃO Jr. *et al*, 1998).

A vitamina E (alfa-tocoferol) é o principal antioxidante lipossolúvel presente nas membranas celulares atuando na proteção contra os danos causados pela peroxidação lipídica. Sua função antioxidante é essencialmente a captura de radicais peroxila (LOO^{\bullet}) e alcóxila (LO^{\bullet}), levando ao término da reação em cadeia da lipoperoxidação através da formação de um aduto não radicalar (GIULIO e MEYER, 2008). A vitamina E não é sintetizada pelos animais e, portanto, só é adquirido por meio da dieta alimentar. Quatro tocoferóis são conhecidos, porém, o α -tocoferol é considerado o biologicamente mais ativo, inclusive no que diz respeito a sua atividade como antioxidante e os termos alfa-tocoferol e vitamina E são quase intercambiáveis na literatura (BENDICH e MACHLIN, 1988; SIES e STAHL, 1995). Ela pode reagir diretamente com radicais livres como o superóxido, a hidroxila e também com o oxigênio singlete (MACHLIN e BENDICH, 1987).

A vitamina C (ácido ascórbico) é altamente solúvel e em pH fisiológico encontra-se na forma de ascorbato. Plantas e diversos animais são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, com exceção de humanos e outros animais como cobaias, morcegos e macacos, que o obtêm

através da dieta (NAIDU, 2003). O ascorbato serve como co-fator para várias enzimas, incluindo a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase envolvidas na síntese de colágeno, bem como para a dopamina- β -hidroxilase que catalisa a conversão da dopamina em norepinefrina. O ascorbato é um poderoso agente redutor (doador de elétrons), que atua na remoção de várias espécies reativas de oxigênio (EROs), como o $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} e $HOCl$ (HALLIWELL, 1996). O ácido ascórbico participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E. Esta reação representa uma importante cooperação entre estas vitaminas para manter ativo o α -tocoferol dentro das membranas (SIES e STAHL, 1995).

Além dos antioxidantes citados, vários componentes endógenos tem efeito antioxidante e participam contra as espécies reativas do oxigênio, como bilirrubina, estradiol, coenzima Q, ácido úrico, melatonina, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Existem ainda vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com enzimas dentre os quais destacam-se: o zinco, o cobre, o manganês e o selênio (MACHLIN e BENDICH, 1987).

Muitos estudos sobre o estresse oxidativo em peixes focalizam aspectos toxicológicos, com relação aos efeitos de diferentes xenobióticos sobre a atividade de enzimas oxidantes e sobre a intensidade de peroxidação lipídica (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005). Entre os indicadores mais investigados nesses animais estão as enzimas presentes no tecido hepático, envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, englobando as enzimas de biotransformação de fase I, fase II, co-fatores e as enzimas antioxidantes. Estas enzimas podem constituir um bom biomarcador molecular de estresse oxidativo e também podem indicar a magnitude de respostas em populações cronicamente expostas ao agente contaminante, tais como, metais pesados e outros xenobióticos (ZHANG *et al.*, 2004).

Em estudos realizados por OZCAN ORU *et al.* (2004), com carpa comum (*Cyprinus carpio*) e com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), expostos a dois pesticidas, indicaram

que os peixes desenvolveram respostas adaptativas tecido-específicas para proteger as células contra o estresse oxidativo, sendo que em brânquias houve aumento na atividade da SOD comparado ao rim e cérebro. A exposição individual e combinada aos pesticidas causaram elevação na atividade da catalase e na GPx nas carpas. Este estudo também mostrou que a carpa comum apresentou maior sensibilidade a exposição ao pesticida do que a tilápia do Nilo.

FILIPAK-NETO *et al.* (2008) submeteram hepatócitos de *H. malabaricus* a diferentes concentrações de DDT (diclorodifeniltricloroetano) e MeHg (monometilmercúrio), além, da associação entre estes dois contaminantes verificaram que em todos os tratamentos, as atividades das enzimas, catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) foram afetadas. FAROMBI *et al.* (2007), verificaram que em *Clarias gariepinus*, a presença de altas concentrações de cádmio, zinco, chumbo, cobre e arsênio causaram alterações nas enzimas antioxidantes (sistema glutathione), e indução de peroxidação lipídica. Estes estudos fornecem a evidência de que biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos de estresse oxidativo podem ser indicadores sensíveis para o monitoramento de poluição aquática.

3.5.4 Teste do micronúcleo

O emprego de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos são ferramentas importantes para a avaliação da qualidade hídrica, pois permitem detectar e avaliar o efeito dos poluentes no ecossistema aquático, e também as alterações de seu potencial tóxico após interação com o ambiente (JESUS e CARVALHO, 2008).

Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas nos organismos é o teste do micronúcleo (MN). Este tipo de teste *in vivo* foi inicialmente desenvolvido por SCHIMID (1975) em eritrócitos de camundongos, sendo amplamente aceito para detectar anomalias cromossômicas estruturais ou numéricas

induzidas por agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) ou de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (NEPOMUCENO *et al.*, 1999; FENECH, 2000).

Os micronúcleos são originados de fragmentos cromossomáticos acêntricos ou de cromossomos inteiros que sofreram retardo na divisão celular devido à ausência ou dano do centrômero ou um defeito na citocinese. Estas pequenas estruturas secundárias de cromatina são rodeadas por membranas localizadas no citoplasma e não tem ligação com o núcleo da célula, apresentando deste modo, a aparência de pequenos núcleos chamados de micronúcleos (HEDDLE *et al.*, 1991; ZOLL-MOREUX-FERRIER, 1999). Os micronúcleos possuem um tamanho que corresponde de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Os micronúcleos são estruturas fáceis de serem visualizadas em eritrócitos e são muitas vezes utilizadas para medir aberrações cromossomais (PALHARES e GRISOLIA, 2002).

O teste de micronúcleo em peixes é geralmente baseado em eritrócitos do sangue periférico, porém os eritrócitos dos rins e tecidos branquiais também são utilizados (AL-SABTI e METCALFE, 1995). O fato do rim ser o principal tecido hematopoiético em peixes, um número maior de eritrócitos micronucleados podem ser encontrados no rim dos que nas brânquias. Para o biomonitoramento a análise de micronúcleo com amostragem do sangue periférico é apropriada e sensível o bastante para o monitoramento de toxicidade (PALHARES e GRISOLIA, 2002).

Vários estudos demonstram que os eritrócitos periféricos de peixes possuem alta incidência de micronúcleos após a exposição a diferentes poluentes sob condições ambientais (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Na bacia amazônica, PORTO *et al.* (2005), avaliaram pelo teste do micronúcleo, o efeito genotóxico de altas concentrações de mercúrio no rio Madeira,

examinando três espécies da região (*Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris*, e *Hoplias malabaricus*), observando ação genotóxica significativa quando comparado ao controle negativo (área não poluída).

SOUZA e FONTANETTI (2006) utilizaram o teste de micronúcleo e de anormalidade nuclear em eritrócitos de *O. niloticus*, para avaliar a qualidade da água do rio Paraíba do Sul (São José dos Campos-SP), em área que recebe efluente de refinaria de óleo. Os autores verificaram que embora o efluente fosse submetido a tratamento, este não foi suficiente para evitar o impacto ambiental, uma vez que os agentes citotóxicos capazes de induzir a formação de micronúcleos em *O. niloticus* foram detectados nos pontos onde os efluentes eram liberados no rio Paraíba do Sul. Além disso, o decréscimo no nível da água durante a estação seca (maio a agosto) favoreceu a alta concentração de poluentes no rio Paraíba do Sul, e a indução mais elevada de micronúcleos é encontrada durante este período. Por outro lado, menor incidência de micronúcleos foi observada na estação de chuva (novembro a janeiro).

Muitas substâncias químicas são foco de atenção devido ao seu potencial mutagênico e carcinogênico, especialmente aqueles que possam ameaçar seriamente o ambiente e os organismos nele inseridos. O teste do micronúcleo em peixes desempenha importante papel na avaliação da exposição a agentes genotóxicos como os metais pesados (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2007; ANDREIKËNAITË *et al.*, 2007; SANCHEZ-GALAN *et al.*, 2001), herbicidas (MORON *et al.*, 2006; ÇAVAŞ e KÖNEN, 2007; VENTURA *et al.*, 2008), piretróides (CAMPANA *et al.*, 1999), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (PACHECO e SANTOS, 2002), benzeno (BÜCKER *et al.*, 2006), ciclofosfamida (MATSUMOTO e CÓLUS, 2000; PALHARES e GRISOLIA, 2002), entre outros elementos.

Embora, diferenças interespecíficas no metabolismo, no reparo de DNA e proliferação de células no organismo alvo, são fatores que podem afetar a sensibilidade em diferentes

espécies de peixes ao genotóxico. O ensaio de micronúcleos demonstra ser uma técnica com potencial para a monitoração e detecção de agentes genotóxicos na água.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização dos testes

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Pesquisa em Aquicultura, do Instituto de Pesca em São Paulo, em sala aclimatada, com manutenção de temperatura ambiente constante e controle do fotoperíodo.

A metodologia dos bioensaios foi padronizada de acordo com as recomendações expressas por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – APHA (2005).

4.2 Variáveis físicas e químicas da água

A água de abastecimento urbano foi utilizada como fonte de água de diluição para os testes de toxicidade aguda e crônica. O cloro residual desta fonte foi eliminado por meio de filtragem (filtros tipo cunho em duas séries de substrato de carvão), seguido de forte aeração.

As seguintes variáveis físicas e químicas da água foram mensuradas no início e a cada 24 horas, durante o experimento: a temperatura (°C) e o oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} e % de saturação) foram aferidos em oxímetro YSI - Mod.55; os valores de pH foram obtidos com potenciômetro e a condutividade elétrica (μScm^{-1}) por condutivímetro. A análise da dureza foi feita pelo método titulométrico com EDTA, alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$) por titulometria e amônia total ($\text{mg NH}_4.\text{L}^{-1}$) pelo método colorimétrico do reagente de Nessler, sendo essas análises realizadas ao final dos experimentos.

4.3 Testes de toxicidade aguda

4.3.1 Aclimação e substância química-teste

Nesta etapa do estudo foram utilizados alevinos de tilápia, (*O. niloticus*), provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de $0,52 \pm 0,10$ g e comprimento total médio de $3,35 \pm 0,36$ cm, aclimatados pelo período de uma semana, em tanque com água declorada com capacidade de 250 L. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial

floculada, com 30% de proteína bruta, e ficaram sob observação a fim de verificar possíveis sinais de doenças, estresse, presença de parasitos, danos físicos e mortalidade. Após o período de aclimação os peixes foram transferidos para aquários dotados de aeração artificial, contendo 5 L de solução-teste. A densidade foi de dois peixes/L e o sistema utilizado foi o semi-estático, em que três litros da solução foi substituída a cada 24 horas (Figura 1). O período total de exposição foi de 96 horas, durante os quais os peixes não foram alimentados (APHA, 2005).

A substância química utilizada foi o permanganato de potássio (KMnO_4). A solução estoque foi previamente preparada, onde 1 g de KMnO_4 foi diluído em 1000 ml de água MILLI-Q, resultando em solução concentrada de 1000 mg.L^{-1} de KMnO_4 .



Figura 1 - Bateria de teste de toxicidade aguda (CL50;96h) com alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas ao permanganato de potássio.

4.4 Teste preliminar

Para estabelecer as concentrações de permanganato de potássio utilizadas neste estudo foi realizado, inicialmente, um teste preliminar, com concentrações baseadas em doses mínimas e máximas de permanganato de potássio, registradas na literatura para tratamento de doenças em peixes (FRANCIS-FLOYD e KLINGER, 1997; PAVANELLI *et al.*, 2002). Para

tanto, foram testadas seis concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16 mg.L⁻¹ e um controle, com três réplicas e 96 horas de duração. Neste teste foi estabelecido o intervalo das concentrações de permanganato de potássio para a realização do teste definitivo.

4.5 Teste definitivo

Com base nos resultados obtidos no teste preliminar foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ e um controle, com três réplicas, totalizando 18 aquários em utilização simultânea.

A mortalidade foi registrada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, com a retirada dos organismos mortos.

4.7 Teste de toxicidade crônica

Os peixes utilizados nesta etapa foram jovens de tilápia (*Oreochromis niloticus*), adquiridas em piscicultura comercial, com peso médio de 44,52 ± 11,07 g e comprimento médio de 13,87 ± 1,14 cm (Figura 2). Os peixes utilizados nos testes foram aclimatados pelo período de 15 dias, em tanque com água de clorada com capacidade 1000 L. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 30% de proteína bruta.



Figura 2 – Jovem de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizada no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio.

Ao final do período de aclimação, os peixes foram transferidos para caixas d'água de 350 L providas de aeração artificial e filtros biológicos previamente maturados, com os

seguintes tratamentos: controle, 1,0 mg.L⁻¹ e 4,0 mg.L⁻¹. As concentrações testadas nesta etapa do experimento foram baseadas de acordo com as concentrações mínimas e máximas, descritas na literatura desse composto utilizadas por piscicultores para tratamento de doenças em peixes (FRANCIS-FLOYD e KLINGER, 1997; PAVANELLI *et al.*, 2002). O experimento foi conduzido durante 30 dias, na densidade 7,5 g de peixes/L por caixa, com coletas (Figura 3). As coletas foram realizadas nos intervalos de 0, 7, 15 e 30 dias, com amostragens de 10 peixes por tratamento. Durante o experimento, os peixes foram alimentados a vontade com ração extrusada, contendo 30% de proteína bruta. A cada três dias foi realizada sifonagem do excedente de ração e de excretas e substituição de 1/3 da água, por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.



Figura 3 - Estrutura dos tanques utilizados no experimento de toxicidade crônica com permanganato de potássio.

4.7.1 Avaliação hematológica

Os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína numa concentração de 10 mg.L⁻¹ e o sangue imediatamente retirado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas (Figura 4) para as determinações de: a) número total de células e contagem de leucócitos, em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de

Hayen como diluente; b) contagem total e diferencial dos leucócitos e contagem total de trombócitos em extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo ROSENFELD (1947); c) hematócrito, pelo método do microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); d) taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944).

Foram calculados os seguintes índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo WINTROBE (1934).



Figura 4 - Coleta de sangue por punção caudal em jovem de tilápia, *Oreochromis niloticus*, para análise das variáveis hematológicas e teste de micronúcleo, no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio.

4.7.2 Teste de micronúcleo

Para esta análise foram confeccionadas extensões sanguíneas que, após secagem, foram fixadas em metanol P.A., por 10 minutos e em seguida, em ácido clorídrico 5 N, por 10 minutos. As lâminas foram coradas pelo método Fielgen/Fast Green. Depois de seco, o material foi observado em microscópio de luz para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. A análise citogenética foi realizada em microscópio de luz em

aumento de 1000x, com contagem de 2000 células por lâmina. Os micronúcleos foram identificados seguindo o critério proposto por FENECH *et al.* (2003).

4.7.3 Atividade fagocítica de macrófago *in vivo*

Para avaliar o efeito do permanganato de potássio sobre a atividade fagocítica de macrófagos da tilápia, (*O. niloticus*), seis animais distintos dos que foram usados para as análises hematológicas, de cada grupo foram anestesiados e, em seguida, injetados intraperitonealmente com concentração de 8×10^3 cél/mm³ de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e mantidos em aquários com aeração contínua, por quatro horas (Figuras 5a e b). O tempo de quatro horas de inoculação de leveduras, utilizado neste ensaio foi o suficiente para a migração total dos macrófagos para o foco inflamatório e para a realização da fagocitose. Este tempo foi anteriormente determinado em *O. niloticus*, nos estudos realizados por CARVALHO (2008a).

Após o período de incubação, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína na concentração de 100 mg.L⁻¹. Em seguida, os peixes foram mortos e a cavidade celomática foi aberta e lavada com 3 mL de solução de PBS (0,7%). O líquido contendo as células inflamatórias foi aspirado com pipetas Pasteur (Figura 5c). Este lavado foi centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pelete formado foi resuspenso e transferido para uma lâmina coberta por lamínula e os macrófagos foram observados sob microscopia de contraste de fase. Foram então realizadas a contagem do número de macrófagos fagocitando e número total de leveduras no interior dos macrófagos, para o cálculo da capacidade fagocítica (CF) e o índice fagocítico (IF) segundo metodologia proposta por SILVA *et al.* (2002 e 2005), onde:



Figura 5 - Realização da avaliação de fagocitose em tilápia, *Oreochromis niloticus*, no teste de toxicidade crônica com permanganato de potássio; (a) injeção intraperitoneal de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*; (b) peixes mantidos em aquários durante o período de incubação de 4 horas; (c) realização do lavado na cavidade celomática.

$$CF = \frac{\text{número de macrófagos fagocitando}}{100 \text{ macrófagos}}$$

$$IF = \frac{\text{n. total de leveduras no interior dos fagócitos}}{\text{n. total de fagócitos ativos}}$$

4.7.4 Análises bioquímicas

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Aquática e Morte Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba, PR.

Logo após a coleta de sangue para as análises hematológicas, os 10 animais de cada tratamento foram anestesiados e sacrificados e uma porção do fígado coletada. Este material foi acondicionado em criotubos e mantido a -80°C até o momento da análise.

Posteriormente, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão PBS e alíquotas foram feitas para as seguintes análises: concentração de proteínas, glutathione S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), catalase (CAT) e peroxidação de lipídeos (LPO).

4.7.4.1 Determinação da concentração de proteína total

Com o objetivo de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Para isso 10 μL da amostra (fígado homogeneizadas em tampão PBS) foram pipetados diretamente em cada poço

de uma microplaca (4 réplicas) e em seguida foram adicionados 250 μL do reativo de Bradford. Então, procedeu-se a leitura das absorvâncias ($\lambda = 620\text{nm}$), utilizando-se PBS como branco. As concentrações de proteínas foram obtidas comparativamente aos valores de absorvância da curva padrão BSA (albumina de soro bovino) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de BSA.

4.7.4.2 Atividade enzimática da glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da enzima glutathiona S-transferase foi monitorada por meio da reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH), reação esta catalisada pela GST e que forma um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorvância a 340nm.

Inicialmente, foi realizado um teste para padronização das concentrações do CDBN e GSH (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 e 5 mM de CDBN/GSH). A partir desse ensaio foi escolhida a concentração de CDBN ($\cong 10$ vezes o valor do K_M) e de GSH (\cong o próprio valor do K_M).

Posteriormente as amostras foram descongeladas e 15 μL da amostra pipetado em microplaca (4 réplicas) e, imediatamente antes da leitura, adicionou-se 135 μL do meio de reação (CDNB a 2mM + GSH a 4 mM, etanol a 4%, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5). O aumento da absorvância foi registrado em intervalos de 10 segundos durante dois minutos. Foi selecionado o primeiro intervalo de um minuto com $r^2 \geq 0,99$ para cálculo do Δ absorvância por minuto.

4.7.4.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

As amostras foram descongeladas e para cada 250 μL de amostra foram pipetados 100 μL de TCA (12,5%) e então centrifugado a 2000 rpm por cinco minutos, para precipitação protéica. Em seguida, foram pipetados em microplaca 30 μL do sobrenadante da amostra + 200 μL de tampão tris pH 8,9 e, por último, 50 μL de DTNB (ácido 5,5'- ditio-bis-2-nitrobenzóico), imediatamente procedeu-se a leitura das absorvâncias ($\lambda = 415\text{nm}$). Como

branco utilizou-se 2 μL de PBS + reagentes. A determinação da GSH foi obtida comparativamente com a curva padrão GSH (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 $\mu\text{g/ml}$)

4.7.4.4 Atividade enzimática da catalase (CAT)

As amostras foram descongeladas e 10 μL da amostra foi pipetada em cubeta de quartzo, em seguida foram adicionados 990 μL do meio de reação (água MQ+Tampão tris 1M, EDTA 5mM+H₂O₂ a 30%). Imediatamente após serem misturados por imersão, realizou-se a leitura da absorbância em $\lambda=240\text{nm}$, em intervalos de 1 segundo, por 45 segundos. A partir dos valores de absorbância, através de regressão linear, foi escolhido o primeiro intervalo de 30 segundos com $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorbância por minuto.

Antes das análises foi feito um ensaio para padronização da concentração de peróxido de hidrogênio que seria utilizado no meio de reação (testaram-se as concentrações 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 mM de H₂O₂).

4.7.4.5 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method*) que se baseia na rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³-laranja de xilenol na presença do estabilizador butilado, que absorve luz a 550-570nm.

Para a realização desta análise as amostras, que foram previamente homogeneizadas em PBS, foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 200 μL do sobrenadante da amostra mais 1250 μL do meio de reação (laranja de xilenol, H₂SO₄, BHT e FeSO₄ NH₄) foram pipetados diretamente em microplacas de fundo chato com 96 poços (4 réplicas). Após 30 minutos de reação em microplacas tampadas, procedeu-se a leitura das absorbâncias ($\lambda = 570\text{nm}$).

4.8 Ensaios ecotoxicológicos

4.8.1 *Ceriodaphnia dubia*

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesca (SP).

O organismo-teste utilizado foi a *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea: Cladocera), uma espécie comumente recomendada para ensaios desta natureza (LOMBARDI, 2004). A água utilizada foi de fonte natural, coletada no Ribeirão do Piraí, no município de Salto de Itú (SP) e filtrada em duas etapas: a primeira em rede de zooplâncton (60 µm) e a segunda, em papel filtro qualitativo para ser utilizada tanto no cultivo desses organismos, como na diluição das amostras-teste. Seus aspectos de qualidade e indicação para o uso foram previamente atestados antes e durante os ensaios, conforme ABNT (2005), pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Pesca – SP e também por outros laboratórios como o da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB e o Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares do Brasil – IPEN.

As variáveis aquáticas foram: dureza (mg.L⁻¹), pH, alcalinidade (mg.L⁻¹ CaCO₃), OD (mg.L⁻¹), temperatura (°C), condutividade elétrica (µS/cm), turbidez (NTU), fósforo total (mg.L⁻¹), nitrogênio amoniacal total (mg.L⁻¹), nitrogênio total (mg.L⁻¹), nitrito (mg.L⁻¹) e nitrato (mg.L⁻¹), seguindo a metodologia APHA *et al.* (2005).

As condições dos ensaios de toxicidade aguda e crônica seguiram sistema semi-estático de sete dias, conforme CETESB (1991) e ABNT (2005). Assim, a troca total da amostra e recipiente ocorria, diariamente, a partir de 48 horas decorridas de seu início.

Dez réplicas foram conduzidas simultaneamente para cada tratamento e apenas um organismo com idade inicial de seis a 24 horas (neonato) foi adicionado para cada réplica, incluindo o grupo controle. Como alimento utilizou-se 0,02 mL/organismo de ração fermentada com teor de 2,50 g.L⁻¹ de sólidos-totais e 0,04 mL/organismo de suspensão de

microalgas da espécie *Pseudokirchneriella subcaptata* (clorofícea), na proporção aproximada de $2,0 \times 10^5$ células/mL (ABNT, 2005).

Os recipientes-testes foram acondicionados em incubadora com temperatura média de $25,0 \pm 0,7$ °C, fotoperíodo de 16 horas claro: oito horas escuro e luminosidade de 1.000 lux (Figura 6).



Figura 6 - Vista do experimento com *Ceriodaphnia dubia*, como organismo-teste, expostas ao permanganato de potássio.

As concentrações utilizadas nesse ensaio foram: a maior concentração utilizada no experimento com peixes ($4,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$) e outras concentrações obtidas a partir da concentração $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ através das seguintes diluições: 3,1%, 6,2%, 12,5%, 25,0% e 50,0% e 100%, que correspondem as concentrações de 0,12; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de KMnO_4 , respectivamente. Todas essas concentrações foram preparadas em balões

volumétricos e diluídas com a água de cultivo. A adição dessas concentrações deve-se ao fato deste ser o ponto que é o efluente gerado pela atividade em estudo e, que está diretamente associado aos possíveis efeitos tóxicos aos organismos aquáticos (CONAMA, 2005).

A validação dos ensaios foi realizada pela constatação, no grupo controle, de taxa de sobrevivência igual ou superior a 80%, além da observação da média mínima reprodutiva de 12 neonatos por organismo genitor (ABNT, 2005). Além disso, todos os lotes de *C. dubia* utilizados nos ensaios tiveram seus níveis de sensibilidade constatados como dentro dos limites de aceitação de resultados (compreendidos entre ± 2 desvios-padrão da média de resultados pretéritos), através da comparação da carta-controle elaborada com a substância de referência - cloreto de sódio (NaCl).

4.8.2 *Pseudokirchneriella subcapitata*

A realização dos ensaios ecotoxicológicos com algas seguiu as recomendações da ABNT (2005). A espécie escolhida foi *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak, anteriormente denominada por *Selenastrum capricornutum*. O meio de cultivo utilizado foi o meio líquido L. C. Oligo (ABNT 2005). Os ensaios foram realizados três vezes.

Três dias antes do início de cada bateria, um cultivo em massa foi montado com um litro de meio L. C. Oligo e 50 mL de suspensão algácea. Esse cultivo em massa foi mantido em erlenmeyer de volume de dois litros a temperatura de 25°C, com incidência de iluminação constante (4.5000 lux) e aeração mecânica artificial.

Esse pré-cultivo foi necessário para que as algas do inóculo, que foram expostas às concentrações de permanganato de potássio nos testes, estivessem em fase exponencial de crescimento. Segundo SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA (2001) o crescimento de algas no cultivo passa por cinco fases distintas (Figura 7): 1 – fase de indução ou *lag* (maioria das células são viáveis, mas não está em condições de se dividir); 2 – fase exponencial ou *log* (a taxa de crescimento é máxima e constante e as células se dividem regularmente); 3 – fase de

redução de crescimento (redução da taxa de crescimento); 4 – fase estacionária (taxa de crescimento é compensada pela taxa de mortalidade, por isso a população não aumenta); 5 – fase de senescência ou de declínio (taxa de mortalidade é maior que a de reprodução).

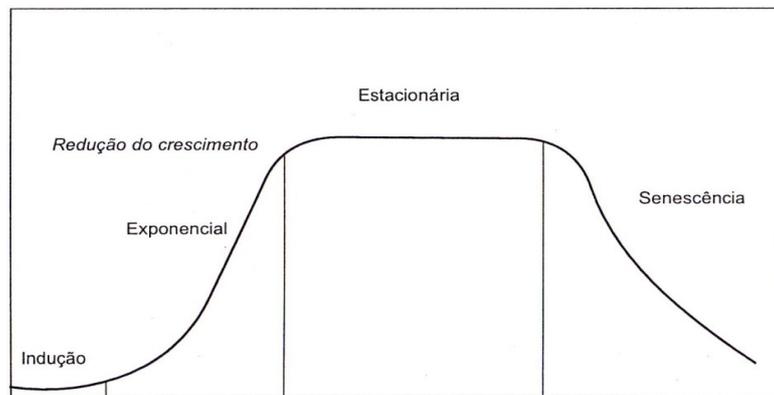


Figura 7 - Diferentes fases da curva de crescimento algácea em sistema de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA 2001).

No dia da realização dos testes, 100 mL do cultivo em massa foi centrifugado por 15 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimentado ressuspensionado em 100 mL de meio de cultura. Este procedimento foi repetido por mais uma vez e dessa nova suspensão, mediu-se o número de células/mL, por contagem em câmara de Neubauer, a fim de se determinar o volume do inóculo a ser utilizado nos testes. Esse processo de centrifugação e ressuspensão foi realizado de modo que os inóculos sempre contivessem 1×10^5 células e volume inferior a 1 mL.

O cálculo do volume do inóculo seguiu a seguinte fórmula: $V_i = \frac{V_f \times C_i}{N}$

Onde:

V_i = volume do inóculo (mL)

V_f = volume da solução-teste (mL)

C_i = concentração inicial do recipiente-teste (células/mL)

N = número de células da suspensão (células/mL)

Os testes consistiram em três replicatas de recipientes-teste (erlenmeyers de 100 mL) para cada concentração, contendo 50 mL de amostra e inóculos com 1×10^5 células de algas. As concentrações utilizadas nesse ensaio foram: a maior concentração utilizada no

experimento com peixes ($4,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KMnO}_4$) e outras cinco concentrações obtidas a partir da concentração $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ pela seguintes diluições: 3,1%, 6,2%, 12,5%, 25,0% e 50,0% e 100%.

Após a inoculação dos recipientes-teste, os frascos foram cobertos com filme plástico e colocados em incubadora por 72 horas sob as condições de 25°C de temperatura, iluminação constante (4.500 lux) e agitação mecânica de 175 rpm. Após as 72 horas de exposição, a quantidade de algas em células/mL, de cada replicata, foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Figura 8).

A validação dos ensaios seguiu o critério da ABNT (2005) para testes de toxicidade com algas de 72 horas de exposição. Foram considerados válidos os ensaios que apresentaram crescimento de biomassa algácea média do controle pelo menos 16 vezes superior à biomassa inicial.

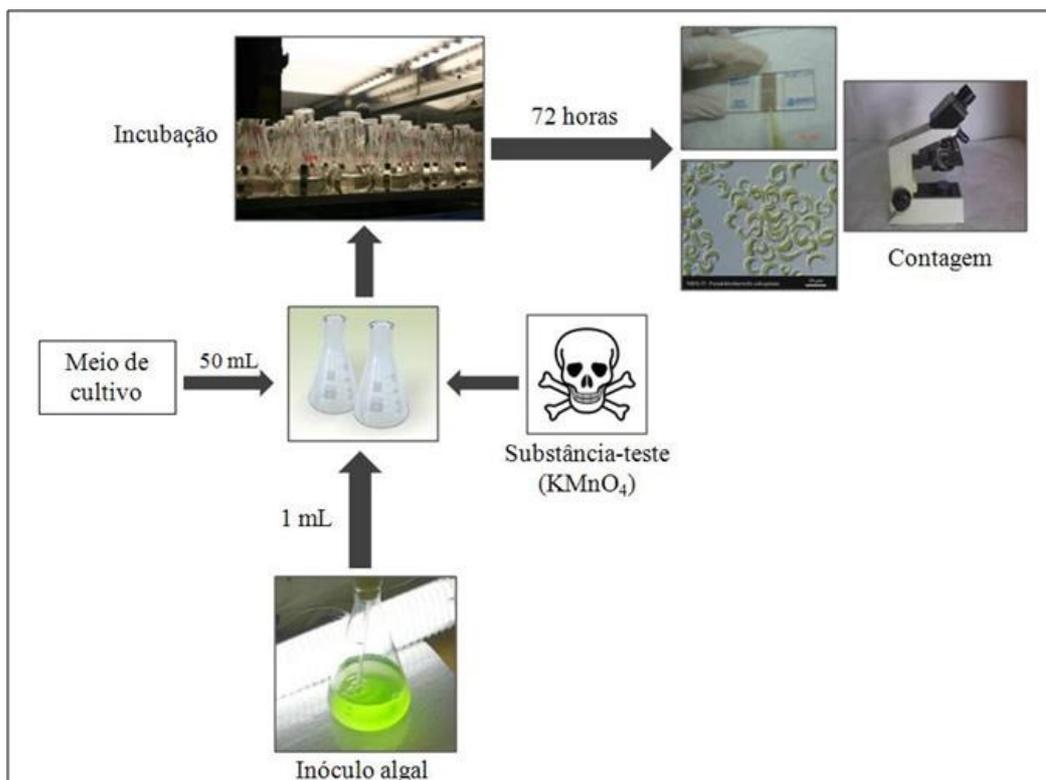


Figura 8 - Procedimentos realizados no ensaio de inibição de crescimento algal com *Pseudochirneriella subcapitata*, como organismo-teste, expostas ao permanganato de potássio.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística utilizada no teste de toxicidade aguda para a determinação da concentração letal média (CL50;96h), foi realizada pelo método Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977).

Para a análise dos dados do teste de toxicidade crônica foi utilizado o programa estatístico TOXSTAT 3.5 (WEST e GULLEY, 1996). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro Wilks e a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida foram submetidos ao teste estatístico “ANOVA” two-way. Para identificar onde ocorreram as diferenças recorreu-se ao teste *post hoc* Scheffé. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 5.0. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

Os valores da concentração de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO) foram estimados, a partir da constatação da existência de diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre uma determinada concentração e o grupo controle. Além disso, a concentração média de inibição da reprodução (CI50;72 h) foi calculada através do método de interpolação linear disponível no programa ICPin (NORBERG-KING, 1993).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Teste de toxicidade aguda

As concentrações de 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ apresentaram elevada toxicidade, sendo que após 24 horas a mortalidade foi de 70 e 100% respectivamente. Nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹, também ocorreu mortalidade elevada no final do período de exposição, com 43,3% e 33,3%, respectivamente. Somente a concentração de 0,5 mg.L⁻¹, não causou toxicidade para os animais expostos, uma vez que ocorreu apenas 3% de mortalidade ao longo de 96 horas, sendo semelhante ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Mortalidade média acumulativa (%) em tilápia, *Oreochromis niloticus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda com permanganato de potássio.

Tratamentos	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
Controle	3,33	3,33	3,33	3,33
0,5	3,33	3,33	3,33	3,33
1,0	26,6	33,3	33,3	33,3
2,0	43,3	43,3	43,3	43,3
4,0	70,0	76,6	80,0	83,3
6,0	100	-	-	-

Durante o período de exposição ao permanganato de potássio, as porcentagens de mortalidade nos alevinos de tilápia foram diretamente relacionadas com as concentrações de permanganato de potássio na água, sendo que este índice foi maior nas primeiras 24 horas de exposição, com poucas mudanças após este período (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por SILVA *et al.* (2006), após exposição aguda (96 horas) de permanganato de potássio em *Colossoma macropomum*. O mesmo foi registrado por MARKING e BILLS (1975), em que a toxicidade do KMnO₄, para dez espécies de peixes, mudou pouco após 24 horas de exposição.

De acordo com FRANCIS-FLOYD e KLINGER (1997), o permanganato de potássio é um agente oxidante capaz de reagir indiscriminadamente com qualquer material orgânico presente na água, incluindo bactérias, parasitos e fungos e também em tecidos de peixes como brânquias e pele. Desta forma, substâncias que são facilmente oxidáveis, rapidamente

decrecem a atividade do permanganato de potássio e esta demanda inicial do composto diminui sua concentração efetiva (MARKING e BILLS, 1975). Isto pode ser facilmente observado pela mudança de cor na água de rosa para castanho, devido a formação do dióxido de manganês (MnO_2), como produto da redução do $KMnO_4$ (STRAUS e GRIFFIN, 2002) (Figuras 9a e b). Portanto, no presente estudo, a presença de material orgânico oxidável nos aquários foi incrementada, a partir da introdução dos peixes à medida produziam metabólitos. Assim, nas primeiras horas do experimento, a pequena quantidade de matéria orgânica parece ter sido determinante para disponibilizar grande parte do $KMnO_4$, o que explica o alto índice de mortalidade no período inicial de exposição (24 horas). Além disso, mesmo com a renovação parcial da solução teste a cada 24 horas, a ação tóxica do permanganato de potássio tornou-se reduzida ao longo do período experimental, devido à presença de maior concentração de matéria orgânica, aumentando a demanda do composto e consequentemente reduzindo sua toxicidade.



Figura 9 - (a) Bateria de teste demonstrando a cor inicial do permanganato de potássio; (b) Cor do reagente após 24 h de exposição indicando sua oxidação no teste de toxicidade aguda com alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*.

Além da mortalidade dos peixes, foi possível observar também, nas soluções com altas concentrações de permanganato de potássio e principalmente nas primeiras 24 horas, sinais de intoxicação dos peixes expostos. A primeira fase se caracterizou por um estado de estresse dos

alevinos ao primeiro contato com o composto, apresentando hiperatividade, com movimentos contínuos em todas as partes do aquário.

A segunda fase permitiu verificar que os movimentos tornaram-se menos contínuos. Porém, os peixes apresentavam escurecimento da pele, maior movimentação das nadadeiras, aumento do batimento opercular e busca por oxigênio na interface água-ar. Este comportamento de busca pelo oxigênio, provavelmente, pode ter sido provocado pela interferência deste componente químico (KMnO_4) no mecanismo respiratório dos peixes, pela formação de minúsculas partículas de sais de óxido de manganês (MnO_2), obstruindo, desta forma, as brânquias dos peixes (KORI-SIAKPERE, 2008).

Na terceira fase, os animais apresentaram movimentos letárgicos até chegar à morte. As mesmas mudanças de comportamento foram observadas por SILVA *et al.* (2006), em alevinos de *C. macropomum*, em concentrações acima de $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de KMnO_4 . STRAUS (2004), também registrou alterações como aumento do movimento opercular, letargia e perda de equilíbrio, após exposição do híbrido “striped bass” (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) em várias concentrações de KMnO_4 .

A concentração letal média (CL50;96h) de KMnO_4 estimada para os alevinos de tilápia foi de $1,81 \text{ mg.L}^{-1}$, com intervalo de confiança (95%) entre 1,48 e $2,22 \text{ mg.L}^{-1}$. No quadro 1 são apresentados os registros de toxicidade aguda com o permanganato de potássio, para diferentes espécies de peixes. Resultados similares ao do presente estudo foram encontrados por BILLS *et al.* (1993), em *Morone saxatilis* com CL50;96h estimada em $1,58 \text{ mg.L}^{-1}$ e por MARKING e BILLS (1975) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), com CL50;96h variando entre 0,879 a $1,73 \text{ mg.L}^{-1}$. No entanto, o valor da CL50;96h estimada neste experimento demonstrou que os alevinos de tilápia possuem menor sensibilidade a este produto químico quando comparado com o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*) (CRUZ *et al.*, 2006), e maior sensibilidade em relação a outras espécies como *Morone saxatilis*, *Clarias*

gariiepinus, *C. macropomum*, *Pimephales promelas* (STRAUS, 2004; KORI-SIAKPERE, 2008; HOBBS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006) (Quadro 1). As variações encontradas nos valores de CL50;96h, podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelas diferenças de espécie, idade ou no tamanho corporal dos peixes.

Quadro 1 - Valores de CL50;96h para o permanganato de potássio em diferentes espécies de peixes.

Espécie	Tamanho	CL50;96h (mg.L ⁻¹)	Referência
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,52 g	1,81	Presente estudo
<i>Clarias gariiepinus</i>	6,2 g	3,02	KORI-SIAKPERE (2008)
<i>Colossoma macropomum</i>	59,1 g	8,60	SILVA <i>et al.</i> (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	alevinos	4,74	HOBBS <i>et al.</i> (2006)
<i>Phallocerus caudimaculatus</i>	1,0 g	0,56	CRUZ <i>et al.</i> (2006)
<i>Morone saxatilis</i>	9,0 g	2,97	STRAUS (2004)
<i>Morone saxatilis</i>	1,0 g	1,58	BILLS <i>et al.</i> (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	alevinos	5,00	HUGHES (1971)
<i>Morone saxatilis</i>	alevinos	2,50	WELBORN (1969)
<i>Tilapia nilotica</i>	alevinos	2,90	DUREZA (1988)
<i>Tilapia nilotica</i>	juvenis	3,30	DUREZA (1988)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2 a 5 cm	1,73	MARKING e BILLS (1975)
<i>Morone saxatilis</i>	alevinos	0,90	REARDON e HARRELL (1994)

MARKING e BILLS (1975), observaram que o efeito negativo do permanganato de potássio nos organismos aquáticos, também pode ser potencializado por fatores físicos e químicos do meio aquático, tais como, em condições de alto pH (8,5 a 9,5), baixas temperaturas (7 a 17 °C) e dureza elevada (180 a 300 mg.L⁻¹ CaCO₃). Diferentes valores de CL50;96h, encontrados por HUGHES (1971) (4,0 mg.L⁻¹) e por REARDON e HARRELL (1994) (0,90 mg.L⁻¹), para *Morone saxatilis* de mesma idade, foram atribuídos pelas diferentes características da água. O alto valor de pH (9,1) registrado no estudo de REARDON e HARRELL (1994), resultou na alta toxicidade do permanganato de potássio. No estudo realizado por STRAUS (2004), a CL50;24h estimada para o híbrido de striped bass (*Morone*

crysops x *M. saxatilis*) foram de 4,47 e 2,97 mg.L⁻¹ de KMnO₄, em água com alcalinidade total de 109 e 213 mg.L⁻¹ (CaCO₃), respectivamente. Segundo o autor a toxicidade aguda do permanganato de potássio foi menor em águas com menor alcalinidade. Porém, neste estudo, os valores de pH, dureza e alcalinidade foram menores quando comparados aos trabalhos citados anteriormente e a temperatura foi mais elevada (Tabela 2), indicando que a toxicidade do permanganato de potássio, neste experimento, provavelmente não foi influenciada pelos fatores abióticos.

Tabela 2 - Valores médios das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda com *Oreochromis niloticus* exposta ao permanganato de potássio.

Variáveis físicas e químicas	Tratamentos (mg.L ⁻¹)					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0
pH	7,53	7,53	7,52	7,48	7,49	7,45
Condutividade elétrica (µScm ⁻¹)	94,90	88,67	90,17	93,54	92,01	107,30
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	7,71	7,67	7,72	7,80	7,92	7,83
Oxigênio Dissolvido (% saturação)	90,10	89,79	90,20	90,82	92,60	91,60
Temperatura (°C)	23,20	23,19	23,10	23,09	23,11	23,20
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	22,67	22,67	22,67	22,67	20,61	41,22
Dureza total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	27,72	25,74	27,72	27,72	31,68	39,60
Amônia não ionizada (mg.L ⁻¹)	0,042	0,034	0,030	0,016	0,025	0,003

De acordo com FRANCIS-FLOYD e KLINGER (1997), o permanganato de potássio nas concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹ pode ser considerado seguro para peixes em banhos de longa duração. Porém, no presente estudo, a concentração de KMnO₄ que causou mortalidade de 50% dos animais foi de 1,81 mg.L⁻¹, indicando a grande sensibilidade dos alevinos de tilápia e a toxicidade deste composto a organismos não-alvo.

6.2 Teste de Toxicidade Crônica

6.2.1 Variáveis físicas e químicas da água

Para as variáveis físicas e químicas da água não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados (Tabela 3).

Tabela 3- Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica com *Oreochromis niloticus* exposta ao permanganato de potássio.

Variáveis físicas e químicas	Tratamentos		
	Controle	1 mg.L ⁻¹	4 mg.L ⁻¹
pH	7,75 ± 0,10	7,72 ± 0,09	7,82 ± 0,08
Condutividade elétrica (µScm ⁻¹)	607,72 ± 268,46	536,63 ± 278,18	482,50 ± 268,27
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	6,95 ± 0,46	6,90 ± 0,32	7,17 ± 0,42
Oxigênio Dissolvido (% saturação)	79,10 ± 3,63	81,17 ± 3,64	81,76 ± 3,73
Temperatura (°C)	22,3 ± 1,55	23,41 ± 0,59	21,86 ± 1,09
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	87,08 ± 13,21	61,86 ± 4,79	80,73 ± 3,90
Dureza total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	158,72 ± 14,46	127,38 ± 13,65	136,92 ± 22,46
Amônia não ionizada (mg.L ⁻¹)	0,007 ± 0,003	0,011 ± 0,008	0,009 ± 0,006

A toxicidade do permanganato de potássio em peixes pode ser influenciada pela qualidade da água, especialmente pela temperatura, pH, dureza e alcalinidade. MARKING e BILLS (1975), observaram que o efeito negativo do permanganato de potássio nos organismos aquáticos foi favorecido por fatores como, alto pH (8,5 a 9,5), baixas temperaturas (7 a 17 °C) e dureza alta (180 a 300 mg CaCO₃.L⁻¹). Neste estudo, os valores de pH e dureza foram menores comparados ao estudo citado acima, e a temperatura apresentou valores acima, variando de 21 a 23°C (Tabela 3). Com relação à alcalinidade, STRAUS (2004) observou que a toxicidade do composto para os peixes foi maior em água com valores acima de 109,13 mg CaCO₃.L⁻¹. No presente estudo, a alcalinidade nas concentrações testadas também apresentou valores menores comparados ao estudo citado acima (Tabela 3). Portanto, as alterações observadas nos peixes podem ser atribuídas à substância química testada.

6.2.2 Avaliações hematológicas

Os peixes mantidos na concentração de 1 mg.L^{-1} de KMnO_4 não apresentaram variações significativas nas variáveis sanguíneas analisadas e nos índices hematimétricos quando comparados ao controle. Os animais expostos à concentração de 4 mg.L^{-1} sofreram redução significativa ($P < 0,05$) no número de eritrócitos no sétimo e no 15º dias de coleta e redução de hematócrito no 30º dia (Figura 10)

O decréscimo nos valores destas variáveis sugere a indução de quadro anêmico no peixe em função da toxicidade do permanganato de potássio. Tais resultados corroboram os registrados em peixes, como em *Labeo rohita* após exposição subletal de cipermetrina e carbofuran (ADHIKARI *et al.*, 2004), em *Cyprinus carpio* expostos ao diazinon (SVOBODA *et al.*, 2001; BANAEI *et al.*, 2008). Segundo estes autores, o quadro de anemia em peixes causado pela exposição à xenobióticos se deve à hemólise, inibição da eritropoiese e da hemosíntese e ao aumento na taxa de destruição de eritrócitos em órgãos hematopoiéticos.

Outra reposta observada neste estudo foi o aumento significativo de HCM, em peixes expostos na concentração de 4 mg.L^{-1} , no sétimo dia de coleta (Figura 10), indicando a presença de células com quantidade de hemoglobina e volume maior. É possível verificar que, mesmo com a variação inversa do HCM em relação ao número de eritrócitos, o nível de hematócrito e hemoglobina não sofreram alterações significativas ($P > 0,05$), apresentando valores próximos do tratamento controle (Figura 10). Além disso, o valor médio de VCM foi maior em relação aos outros grupos, embora não tenha apresentado diferença significativa. Estes resultados sugerem a presença de ampla quantidade de eritrócitos velhos e grandes, provavelmente, devido ao mecanismo prolongado ou falha na reposição destas células (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006), induzindo um quadro de anemia macrocítica.

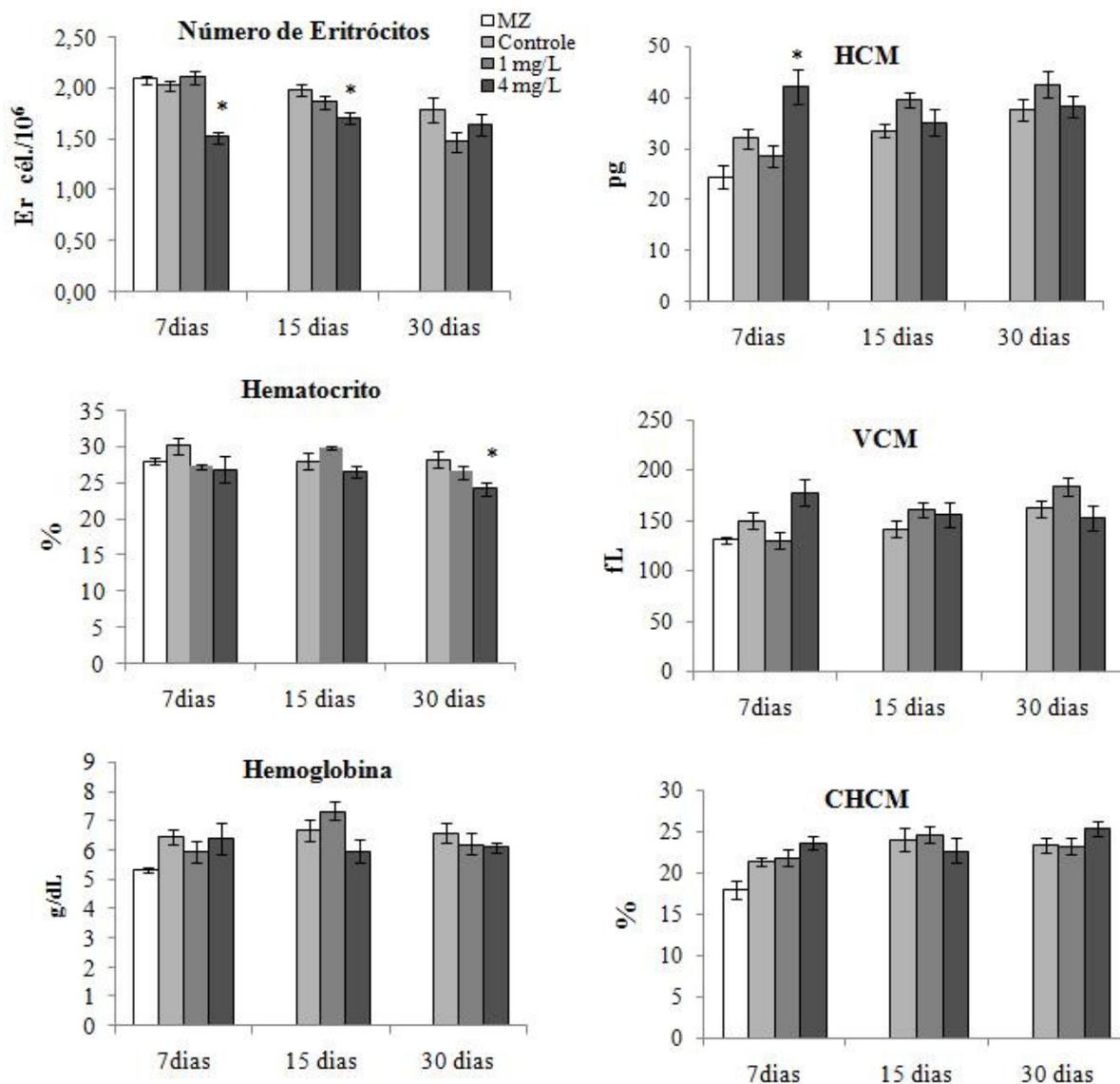


Figura 10 – Médias e erro padrão das médias dos parâmetros sanguíneos no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio; * diferença significativa ($P < 0,05$); HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; MZ: momento zero.

Mudanças na contagem diferencial de leucócitos fornecem uma evidência para o decréscimo da imunidade não específica em peixes após a exposição a substâncias tóxicas, tais como, a deltametrina (SVOBODA *et al.*, 2003) e ao metilmercúrio (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Neste estudo, não foram observadas alterações significativas para linfócitos, neutrófilos e monócitos em ambos os tratamentos comparado ao grupo controle, durante todo o período de exposição. No entanto, foi observado, no sétimo dia de coleta,

decréscimo significativo na contagem total de leucócitos, somente para as tilápias expostas a 4 mg.L⁻¹ de KMnO₄ em relação ao controle (Figura 11).

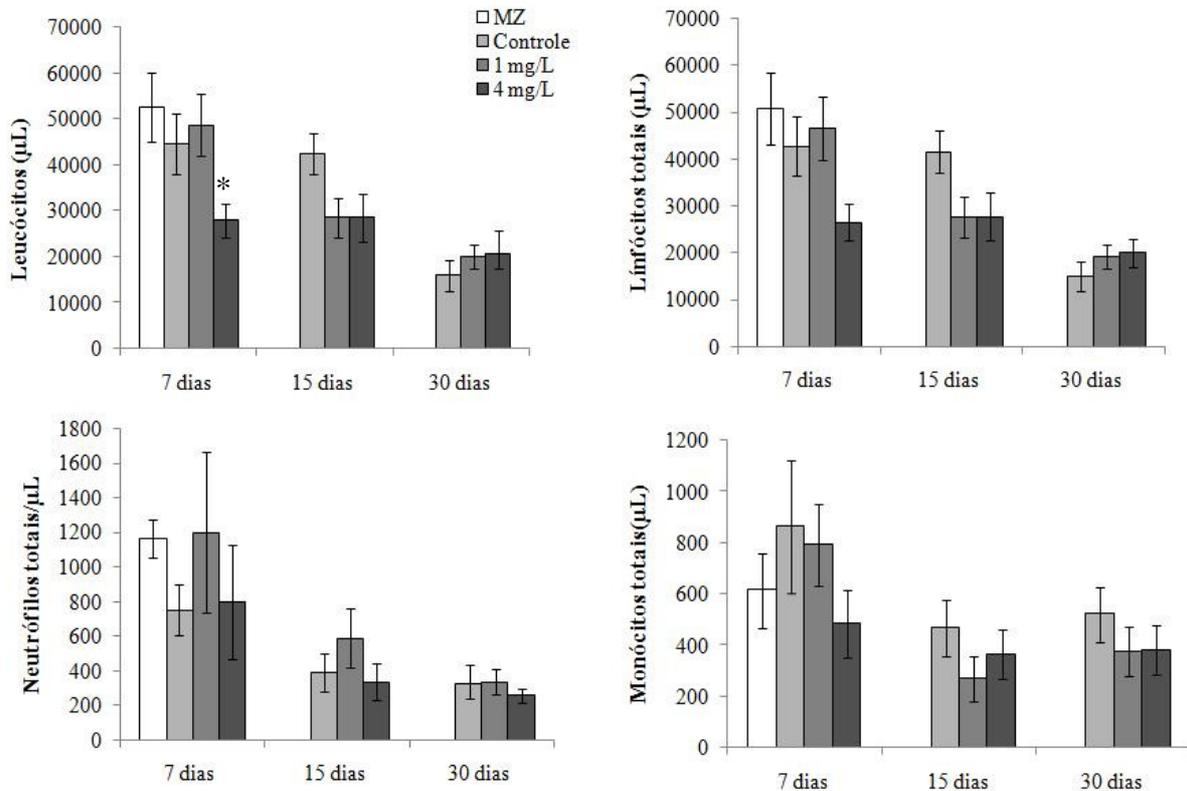


Figura 11 – Médias e erro padrão das médias da contagem total e diferencial de leucócitos no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio; MZ: momento zero.

Dependendo da espécie e das características do ambiente, os linfócitos podem ser as células de maior frequência no sangue periférico de peixes (RANZANI-PAIVA e EIRAS, 1992). Assim como observado por SARDER *et al.* (2001); BARROS *et al.* (2002) e AZEVEDO *et al.* (2006), os linfócitos foram os mais abundantes em *O. niloticus*. Portanto, as variações no número de leucócitos observadas neste experimento, atribuem-se principalmente pela redução no número de linfócitos, embora não tenham apresentado diferença significativa deste com relação ao controle.

AJANI *et al.* (2007) observaram leucopenia em função do decréscimo de linfócitos em *Clarias gariepinus* expostos ao nitrito, atribuído, provavelmente, pela redução na produção e

rápida destruição das células, levando ao aumento na taxa de remoção de linfócitos. SVOBODA *et al.* (2001) e BANNAAE *et al.* (2008) observaram decréscimo na porcentagem de linfócitos e monócitos em *Cyprinus carpio* após exposição ao diazinon, indicando decréscimo da imunidade, em resposta ao estresse causado pela substância tóxica, corroborando os resultados do presente estudo.

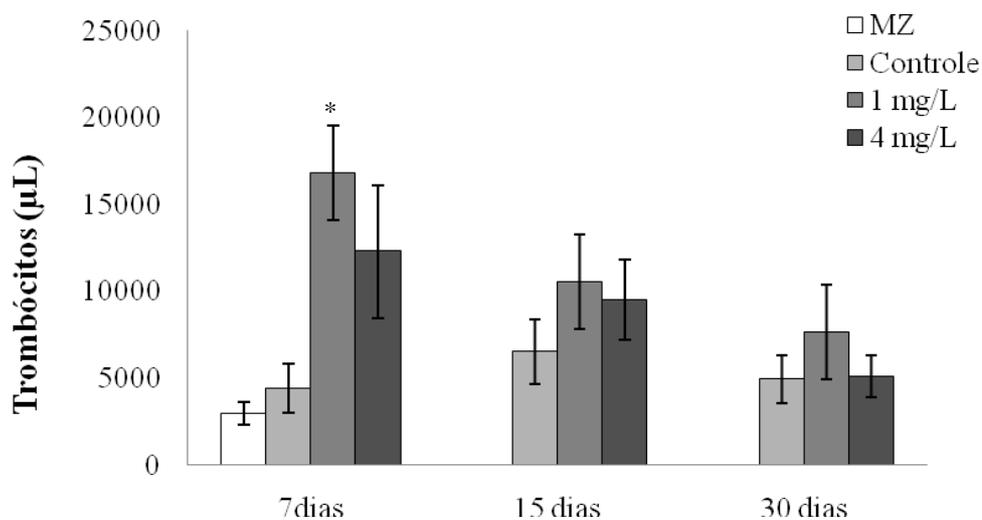


Figura 12 – Médias e erro padrão das médias da contagem total de células sanguíneas no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao permanganato de potássio. * diferença significativa ($P < 0,05$); MZ: momento zero.

Não foram observados eosinófilos em nenhum dos tratamentos testados, já os basófilos foram encontrados apenas em duas amostras do tratamento controle e uma da concentração de 1 mg.L^{-1} . Segundo RANZANI-PAIVA (1995), o relato esporádico de um tipo ou outro de leucócitos pode ser atribuído à pequena porcentagem destas células, podendo muitas vezes passar despercebido.

Embora as funções dos trombócitos em peixes sejam pouco conhecidas, acredita-se na possibilidade de estarem relacionadas com o sistema de defesa, como relatado por MATUSHIMA e MARIANO (1996). No presente estudo, os trombócitos apresentaram-se em grande número em peixes expostos ao permanganato de potássio no sétimo dia de coleta.

Porém, somente na concentração de 1 mg.L⁻¹ houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 12). A elevação no número de trombócitos é registrada em peixes estressados após serem expostos a substâncias poluentes é relacionada com danos causados em órgãos e tecidos (DICK e DIXON 1985; MAZON *et al.*, 2002; SHAH e ALTINDAÚ, 2005; GABRIEL *et al.*, 2007), tais como brânquias, fígado e rim (PANDEY *et al.*, 1996). Entretanto, por se tratar de um forte agente oxidante, os altos valores de trombócitos encontrados em peixes de ambos os tratamentos (1,0 e 4,0 mg.L⁻¹ KMnO₄) do presente estudo, provavelmente podem estar relacionados com lesões causadas em tecidos como pele e brânquias pela exposição ao permanganato de potássio.

De acordo com FRANCIS-FLOYD e KLINGER (1997), o permanganato de potássio é um composto capaz de reagir indiscriminadamente com qualquer material orgânico presente na água incluindo tecidos de peixes como brânquias e pele. Tal hipótese pode ser confirmada por DARWISH *et al.* (2002), onde revelaram que em *Ictalurus punctatus* expostos a concentrações de três a cinco vezes maiores que a recomendada de permanganato de potássio provocou lesões nas brânquias, tais como hiperplasia, hipertrofia epitelial e necroses. Resultados semelhantes foram encontrados por MAZON *et al.* (2002), em *Prochilodus scrofa*, após exposição ao cobre, embora o aumento no número de trombócitos não tenha apresentado diferença significativa, foram identificados focos de hemorragia, devido a ruptura de vasos na lamela branquial em peixes expostos a 29 µg.L⁻¹ de cobre.

6.2.3 Atividade fagocítica de macrófagos

Para a capacidade fagocítica apresentaram redução significativa (P<0,05) na concentração de 4 mg.L⁻¹ aos 7 e 15 dias de exposição em relação ao controle (Figura 13). Em 1 mg.L⁻¹ ocorreu redução significativa (P<0,05) apenas no 15º dia. Estes resultados indicam que o permanganato de potássio diminuiu a atividade fagocítica e a porcentagem de células ativas, apresentando efeito imunossupressivo com típica relação dose-resposta. A supressão na

função dos macrófagos tem sido registrada em *O. niloticus* após exposição aguda ao diazinon (GIRON-PÉREZ *et al.*, 2007), e ao endossulfan (GIRON-PÉREZ *et al.*, 2008) e por metais pesados, como em *Brachydanio rerio* expostos ao zinco e ao cobre (ROUGIER *et al.*, 1994). Além disso, toda a depressão da fagocitose aparece como evidência direta da função imune danificada nos indivíduos (FOURNIER *et al.*, 2000).

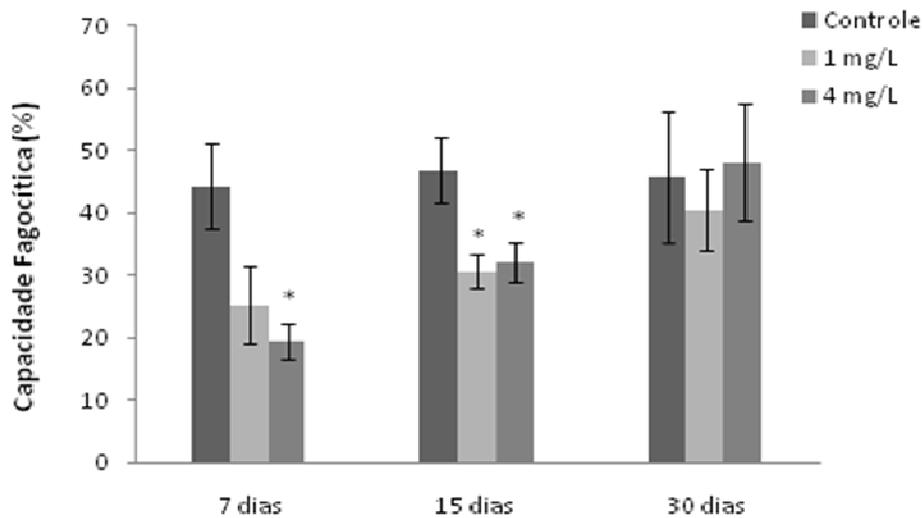


Figura 13 – Capacidade fagocítica de macrófagos de tilápias, *Oreochromis niloticus*, expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta. * diferença significativa ($P < 0,05$).

No entanto, no 30º dia de exposição, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) na capacidade fagocítica nos diferentes tratamentos (Figura 13).

Com relação ao índice fagocítico, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$), entre os tratamentos com relação ao grupo controle, nos diferentes momentos de coleta (Figura 14). O índice fagocítico indica o quanto cada macrófago ativo foi capaz de realizar fagocitose por meio da contagem de leveduras no interior de tal célula.

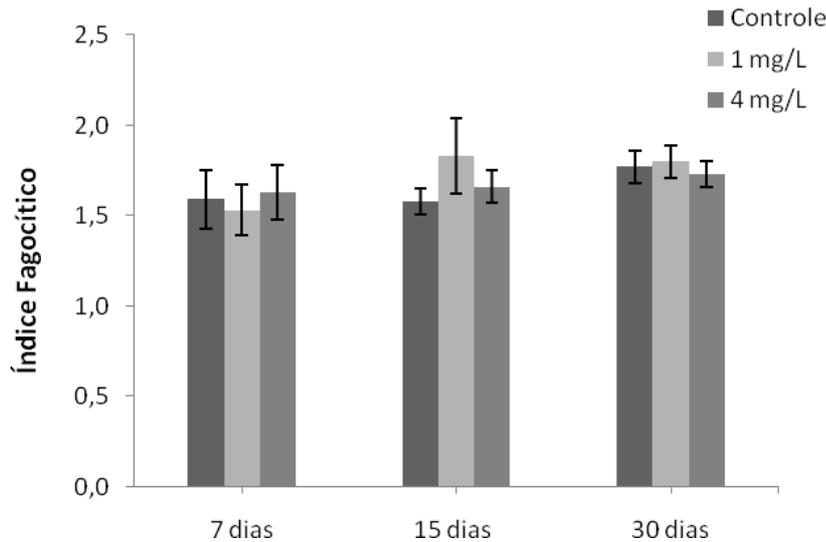


Figura 14 - Índice fagocítico de macrófagos de tilápias, *Oreochromis niloticus*, expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta.

Entretanto, a ausência de variações significativas nos valores do índice fagocítico nos animais expostos ao permanganato de potássio devem-se, provavelmente, ao fato de que, mesmo em baixo número, os macrófagos ativos podem ter fagocitado um número maior de leveduras, encontrando-se, desta forma, valores próximos ao controle. Tilápias (*O. niloticus*), expostas a concentrações sub-letais de sulfato de cobre durante trinta dias, também apresentaram comportamento semelhante ao do presente estudo. Nestes peixes, poucos macrófagos estavam ativos. No entanto, provavelmente, como mecanismo de compensação, os macrófagos apresentaram maior número de leveduras em seu interior elevando, deste modo, o índice fagocítico (CARVALHO, 2008b).

6.2.4 Análises bioquímicas

Para proteger as células contra qualquer dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (EROs), uma bateria de detoxificação está envolvida em organismos aeróbicos. Este sistema de defesa antioxidante inclui o tripeptídeo glutatona. A glutatona reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais

abundante no meio intracelular (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Esta enzima age como redutor celular e reagente protetor contra numerosas substâncias incluindo poluentes. Os níveis de GSH podem ser aumentados devido a um mecanismo adaptável ao rápido estresse oxidativo com aumento em sua síntese. Por outro lado, em uma situação de estresse oxidativo severo, pode ocorrer supressão nos níveis de GSH, devido à perda de mecanismos adaptáveis, além de ocorrer predominantemente oxidação da GSH para sua forma oxidada (GSSG) com menor capacidade de regeneração da mesma por processo de redução (ZHANG *et al.*, 2004).

Neste estudo, no 15º dia de coleta foi observado aumento significativo de GSH nas duas concentrações testadas de permanganato de potássio, quando comparado ao grupo controle (Figura 15), indicando tratar-se de estresse oxidativo. A elevação nos níveis de GSH reflete a estimulação do metabolismo de detoxificação. Em estudos realizados por LIMA *et al.* (2006), foi observado que em sete dias, tilápias expostas a efluentes de indústria suína apresentaram baixos níveis de GSH, por outro lado, após 90 dias de exposição foi observado elevado conteúdo de GSH, GSH-t e GSSG, sugerindo adaptação antioxidante em resposta a exposição crônica. Assim, o aumento nos níveis de GSH sugere reposta adaptativa e de proteção desta biomolécula contra o estresse oxidativo, induzido por substâncias contaminantes (PANDEY *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; FAROMBI *et al.*, 2007).

A GST é uma enzima multicomponente envolvida na detoxificação de muitos xenobióticos, a qual desempenha papel importante protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo (FOURNIER *et al.*, 1992). A conjugação de dado metabólito com a glutathiona reduzida (GSH) é catalisada pela glutathiona-S-transferase (GST) e consiste em ligar o xenobiótico com o GSH endógeno.

Muitos estudos que analisaram a GST em fígado de peixes expostos a diferentes tipos de contaminantes demonstraram a indução enzimática (VENTURA-LIMA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2004; PANDEY *et al.*, 2003; JONSSON *et al.*, 2002). Esta resposta é normalmente

esperada, uma vez que a GST desempenha importante papel na desintoxicação e eliminação de xenobióticos. Por outro lado, RENDON-VON OSTEN *et al.* (2005) relataram que em brânquias de “mosquitofish” (*Gambusia yucatana*) expostos ao carbofurano ocorreu inibição de 40% da atividade da GST. Porém, no presente estudo, não houve variação significativa para a atividade da GST nos peixes entre os diferentes tratamentos e nem ao longo do período de exposição (Figura 16). Embora o permanganato de potássio tenha induzido estresse oxidativo, como evidenciado pelo aumento nos níveis de GSH, este não interferiu na atividade da GST.

VENTURA-LIMA *et al.* (2009) não observaram alterações significativas nos níveis de GST em *Danio rerio* expostos ao arsênio, indicando que as concentrações testadas não foram deletérias ao ponto de interferir na atividade da GST, uma vez que esta enzima está envolvida na detoxificação de moléculas endógenas que causam degradação e oxidação ao DNA das células. SANCHEZ *et al.* (2005) registraram que a exposição ao cobre promoveu estresse oxidativo e expressão de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em tecidos de peixes, mostrado pelo rápido aumento de SOD (superóxido dismutase), catalase e GPx (glutathione peroxidase), porém, para GST não foram observadas alterações significativas. De acordo com TREVISAN (2008), a ausência de alteração nos níveis de GST pode estar associada à baixa carga de poluição.

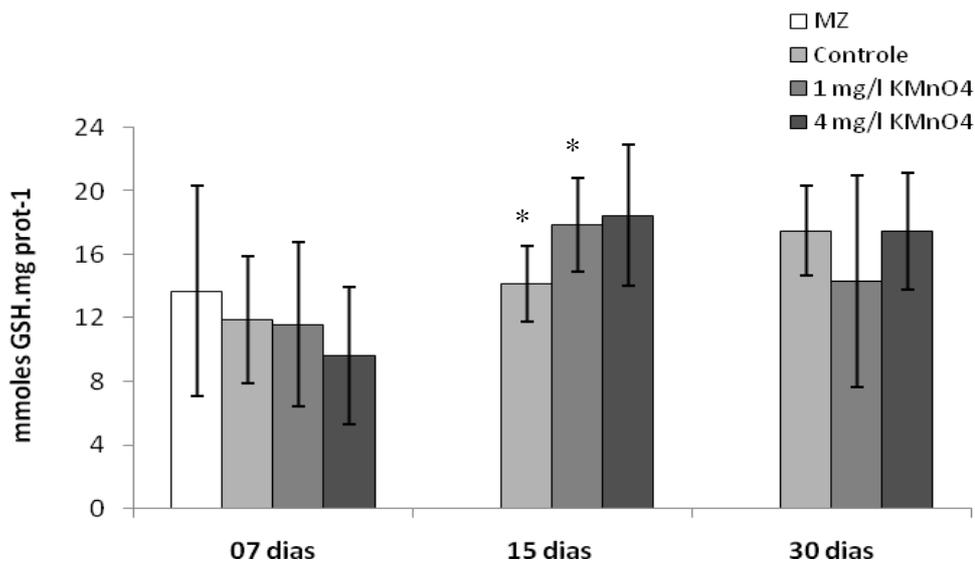


Figura 15- Concentração de glutatona reduzida (GSH) em fígado de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta. * diferença significativa ($P < 0,05$); MZ: momento zero.

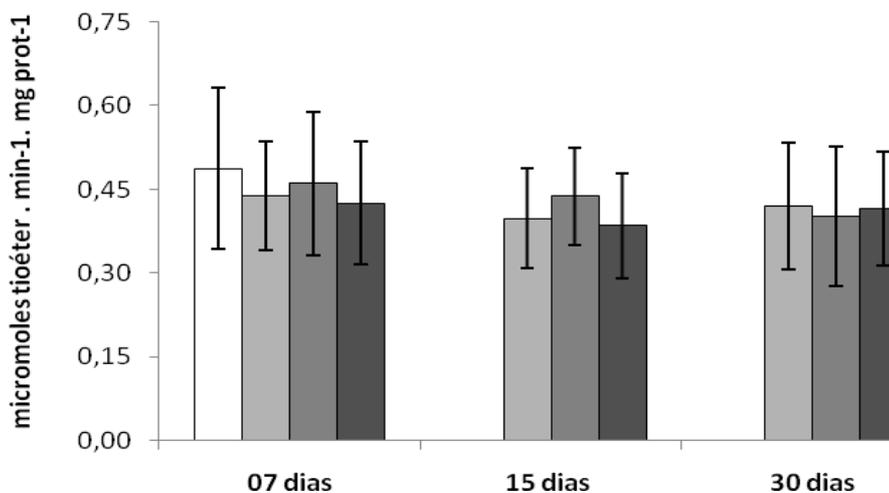


Figura 16 - Atividade específica da glutatona S-transferase (GST) em fígado de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.

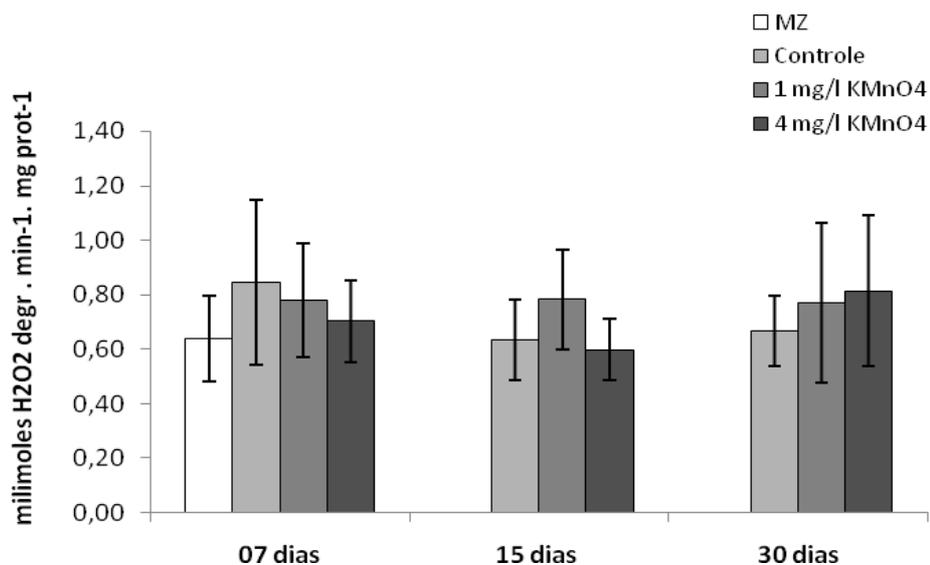


Figura 17 - Atividade específica da catalase (CAT) em fígado de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.

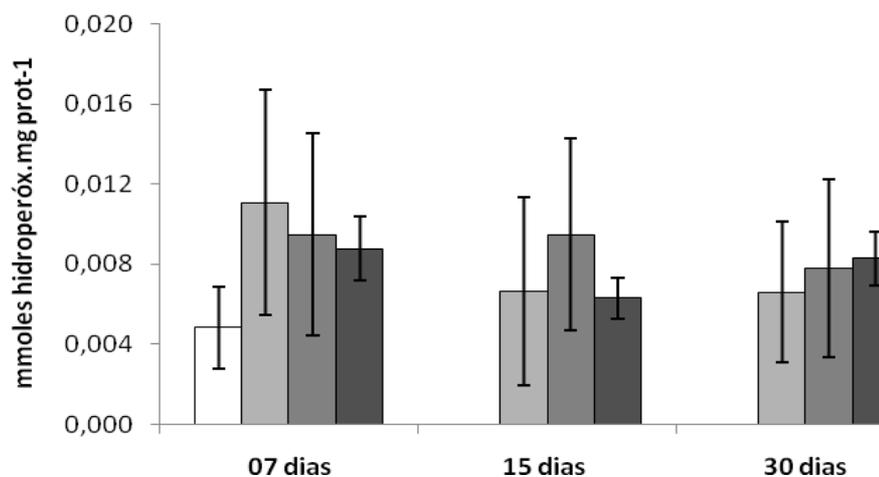


Figura 18- Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos em fígado de tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas a diferentes concentrações de permanganato de potássio nos diferentes momentos de coleta; MZ: momento zero.

Com relação à catalase, esta enzima está localizada principalmente nos peroxissomos, sendo responsável pela redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, onde a GPx catalisa a redução de ambos, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos e é considerada proteção eficiente contra a peroxidação de lipídios (WINSTON e DI GIULIO, 1991).

Neste estudo, assim como observado para a GST, a CAT e os níveis de LPO, também não variaram significativamente entre os tratamentos e ao longo do tempo (Figuras 17 e 18). Isto pode estar associado ao aumento nos níveis de GSH observado para compensar o estresse oxidativo e como resposta adaptativa evitando, assim, o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de dano oxidativo. Resultados semelhantes foram registrados por VENTURA-LIMA *et al.* (2009), onde a ausência de alterações da atividade da GST, CAT e nos níveis de LPO, em peixes expostos ao arsênio, se deve a eficácia do aumento nos níveis de GSH para a prevenção de perturbações oxidativas adicionais. Desta forma, os resultados confirmam que a GSH é freqüentemente a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo.

6.2.5. Avaliação genotóxica

Em peixes, a técnica de micronúcleos é usualmente baseada nos eritrócitos, que nesses organismos são nucleados (AL-SABI e METCALFE, 1995). Os micronúcleos são massas de cromatina com a aparência de pequenos núcleos que provém de fragmentos acêntricos gerados por ruptura (clastogenicidade) ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo da célula-filha durante a divisão celular (aneuploidia), como consequência, geralmente, de enfermidades genéticas (PORTO *et al.*, 2005). O teste de micronúcleo é utilizado para avaliar a exposição de peixes a diversos poluentes em condições de laboratório (FERRARO *et al.*, 2004; ÇAVAŞ *et al.*, 2005; MORON *et al.*, 2006; BÜCKER *et al.*, 2006; ÇAVAŞ e KÖNEN, 2007; VENTURA *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados pelo teste do micronúcleo em jovens de tilápia expostas ao permanganato de potássio (Figura 19) mostraram que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos testados com relação ao controle e nem ao longo do tempo. A partir do período de 15 dias, ocorreu redução no número de micronúcleos, em todos os tratamentos testados. Porém, ao contrário do esperado, a frequência de micronúcleo foi maior nos animais do grupo controle, quando comparado com as duas concentrações de KMnO_4 testadas. Já no período de

30 dias foi possível observar tendência de aumento no número de micronúcleos nos peixes expostos ao permanganato de potássio, principalmente na concentração de 4 mg.L^{-1} comparada ao controle (Figura 19). O baixo número de micronúcleos observado nos tratamentos com KMnO_4 e a ausência de correlação significativa entre os diferentes tratamentos pode ter sido influenciada pela quantidade de eritrócitos presentes.

De acordo com PACHECO e SANTOS (2002), a expressão de efeitos genotóxicos nos peixes, tais como micronúcleos ou outras anomalias nucleares eritrocíticas, pode ser mascarada pela inibição direta da eritropoiese causada por altos níveis de produtos químicos mutagênicos e/ou por um catabolismo eritrocítico aumentado.

CAMPANA *et al.* (1999) observaram que em *Cheirodon interruptus interruptus* expostos a diferentes doses do pesticida piretróide lambda-cialotrim por 24 horas a 23 dias, a frequência de micronúcleos nos eritrócitos foi maior após 24 horas, havendo progressivo decréscimo ao longo do período de tratamento. Porém, no período de 15 dias, foi encontrada no tratamento com a dose mais baixa do piretróide ($0,001 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) uma resposta máxima na frequência de micronúcleos em comparação as outras concentrações testadas ($0,05$; $0,01 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$). Segundos os autores, a explicação para tal resposta seria a mortalidade celular causada pelas maiores concentrações do composto químico e o atraso do ciclo celular.

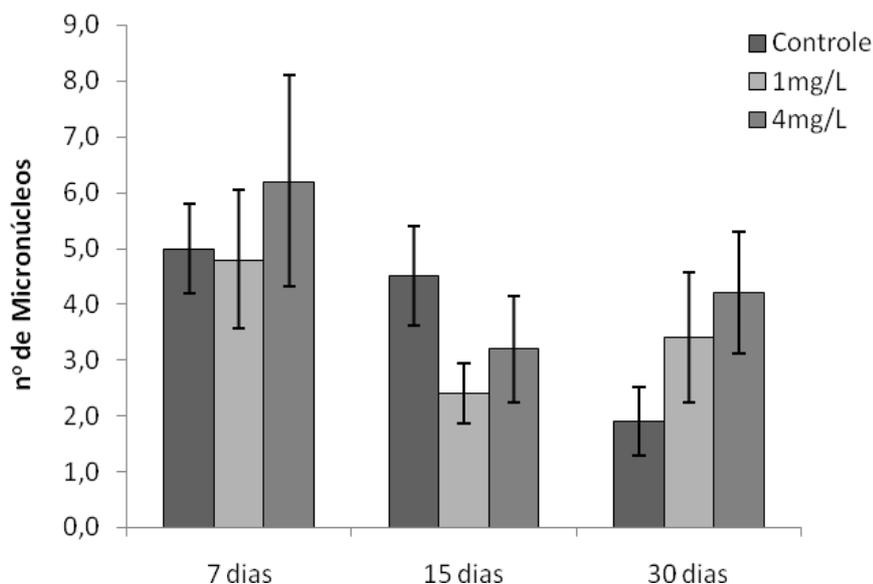


Figura 19 – Variação das médias de células com micronúcleos em tilápia, *Oreochromis niloticus*, expostas às concentrações de permanganato de potássio, nos diferentes momentos de coleta.

Em *Astyanax bimaculatus* expostos a ciclofosfamida, MATSUMOTO e CÓLUS (2000), registraram que ocorreu aumento gradual na frequência do micronúcleo em doses de 4 a 16 mg.kg⁻¹. Ao contrário, na concentração de 32 mg.kg⁻¹, ocorreu redução significativa na frequência de micronúcleo. Este decréscimo sugere que os efeitos tóxicos e inibitórios da dose mais elevada de ciclofosfamida afetem a divisão das células, com subsequente impedimento na passagem das células afetadas para a circulação periférica, já que eles tendem a ser removidos mais rapidamente do organismo do que as células não danificadas.

Tais informações podem ser aplicadas ao presente estudo, uma vez que o permanganato de potássio revelou a habilidade de causar hemólise e inibir a eritropoiese aos peixes expostos, como encontrado nas variáveis sanguíneas aqui analisadas (Figura 10). Conseqüentemente, a expressão de micronúcleos foi afetada pelo número reduzido de eritrócitos. Desta forma, pelo fato dos eritrócitos terem sido produzidos em pequenas quantidades e terem sido removidos da circulação, a expressão do micronúcleo pode ter sido mascarada, apesar da presença do composto genotóxico.

Assim como observado no presente estudo, FERRARO *et al.* (2004), ao trabalhar com traíras (*Hoplias malabaricus*), contaminadas com TBT e Chumbo II teve dificuldade em tratar estatisticamente somente os dados de micronúcleos, mas ao considerar as alterações morfológicas nucleares dos eritrócitos conseguiu constatar diferença entre os grupos testados e o controle.

CARRASCO *et al.* (1990) também encontraram dificuldades ao observar somente a presença de micronúcleos, mas não de alterações morfológico-nucleares. Para estes autores, a frequência de lesão nuclear nos eritrócitos identificada como micronúcleo não é um indicador preciso e eficiente para medida de certos contaminantes, porque alguns desses não são capazes de alterar as fibras do fuso ou não promovem quebras que resultarão em fragmentos acêntricos. Os autores consideraram como aberrações, as lesões nucleares encontradas. Deste modo, pelo fato dos micronúcleos serem menos frequentes, os autores concluíram que a utilização deste teste em peixes nem sempre pode ser uma medida sensível de exposição de alguns agentes genotóxicos específicos.

Neste estudo, durante a contagem de micronúcleo foi possível observar alterações morfológico-nucleares, principalmente, nos peixes expostos ao permanganato de potássio. Porém, a contagem destas lesões não foi realizada, o que sugere recontagem destes eritrócitos para a confirmação de tal hipótese. Somente a contagem de micronúcleo não foi sensível o suficiente para detectar a ação genotóxica do permanganato de potássio, uma vez que este composto causou redução no número de eritrócitos e conseqüentemente mascarou a frequência de micronúcleos.

6.3 Testes ecotoxicológicos

6.3.1 *Ceriodaphnia dubia*

Nos ensaios de toxicidade com *C. dubia* foi possível observar toxicidade aguda a partir da concentração de 6,2%, onde apresentaram mortalidade total (10 indivíduos), já nas primeiras 24 horas de exposição. Na concentração de 3,1%, foi registrada alta mortalidade (7 indivíduos) apenas no ensaio I (Tabela 4).

Tabela 4 - Mortalidade acumulativa de *Ceriodaphnia dubia* ao final de sete dias de exposição a diluições da concentração 4,0 mg.L⁻¹ de permanganato de potássio.

	Mortalidade Cumulativa						
	Controle	3,1%	6,2%	12,5%	25%	50%	100%
Ensaio I	0	7	10	10	10	10	10
Ensaio II	0	2	10	10	10	10	10
Ensaio III	0	1	10	10	10	10	10

A média do número de neonatos do grupo controle e da concentração de 3,1% de todos os ensaios está representada na Figura 20. Observa-se que a concentração de 3,1%, não afetou a sobrevivência e a produção de neonatos, os quais tiveram resultados semelhantes ao grupo controle, indicando a ausência de toxicidade nesta concentração.

As concentrações utilizadas no teste com *C. dubia* foram: 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100% da concentração de 4,0 mg.L⁻¹ de KMnO₄, que correspondem as concentrações de 0,12; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de KMnO₄, respectivamente. Com exceção apenas da concentração de 3,1%, as demais concentrações mostraram-se altamente tóxicas para *C. dubia*. Além disso, tais concentrações estão abaixo das que são consideradas seguras e recomendadas para o uso deste composto na aquicultura, tanto para o tratamento de doenças de peixes que é de 1 a 4 mg.L⁻¹ (FRANCIS-FLOYD e KLINGER, 1997; PAVANELLI *et al.*, 2002), quanto para algicida de 2 e 4 mg.L⁻¹ (SMITH, 2005; DORZAB e BARKOH, 2005), o que indica o quanto este composto pode comprometer a biodiversidade do sistema aquático.

As informações sobre a toxicidade do permanganato de potássio às espécies não-alvo são muito limitados. Entretanto, assim como observado no presente estudo, o potencial tóxico

deste composto, também foram registrados por HOBBS *et al.* (2006), em teste de toxicidade com cinco espécies aquáticas de diferentes níveis tróficos. Nos testes de toxicidade aguda verificaram que a CL50;96h foi de 0,058 mg.L⁻¹, para *C. dubia*; 0,053 mg.L⁻¹ para *Daphnia magna*; 2,13 mg.L⁻¹ para *Pimephales promelas*; 4,74 mg.L⁻¹ para *Hyalela azteca* e 4,43 mg.L⁻¹ para *Chironomus tentans*. De acordo com os autores, a maioria destes valores estão abaixo da taxa recomendada para o tratamento com KMnO₄, que é de pelo menos 2,0 mg.L⁻¹ ou de 2,5 vezes a demanda do permanganato de potássio (uma estimação dos agentes redutores presentes na água). Entretanto, repetindo o mesmo teste em laboratório e com água de tanques, com uma demanda de 5,35 mg.L⁻¹ de KMnO₄, resultou em toxicidade significativamente menor, onde os valores de CL50;96h foi de 2,39 mg.L⁻¹ para *C. dubia*; 1,98 mg.L⁻¹ para *D. magna*; 11,22 mg.L⁻¹ para *P. promelas*; 13,55 mg.L⁻¹ para *H. azteca* e 12,30 mg.L⁻¹ para *C. tentans*. Porém, a dose efetiva para o tratamento de doenças baseado sobre 2,5 vezes a demanda de KMnO₄ foi 13,39 mg.L⁻¹, excedendo a CL50 para muitos destes organismos não alvo, mesmo em água de tanques, o que sugere significante risco ambiental.

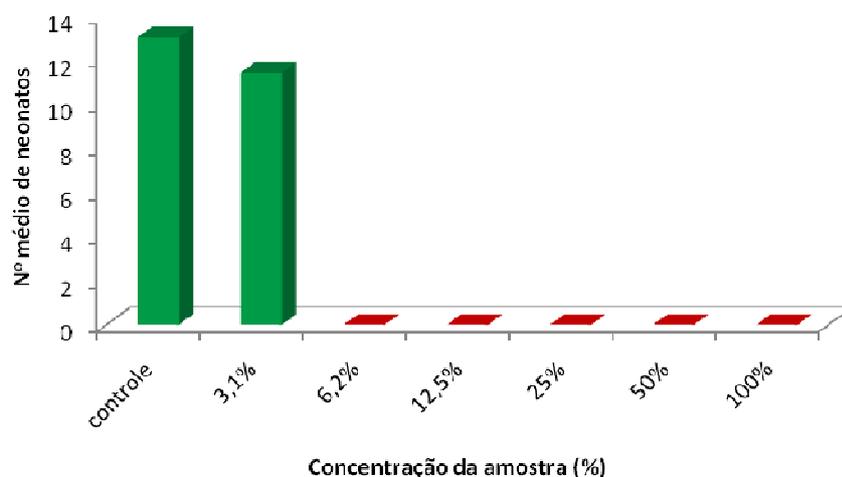


Figura 20 - Representação gráfica da toxicidade para *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes diluições de permanganato de potássio a partir da concentração de 4 mg.L⁻¹.

Outro fator importante é que, na aquíicultura, geralmente, os efluentes de viveiros em que se aplicam produtos químicos são despejados no corpo receptor sem nenhum tratamento prévio (SCHALCH, 2007). Mesmo que parte da droga já esteja inativada quando da liberação no ambiente, a outra parte ainda ativa poderá atuar nas populações naturais deste curso d'água, como peixes, zooplâncton e fitoplâncton (OKUMURA, 2005). Além disso, a presença de xenobióticos pode causar modificações na diversidade e abundância de espécies em diversos níveis da cadeia trófica, favorecendo espécies mais resistentes e eliminando espécies mais sensíveis (WRIGHT e WELBOURN, 2002). Entretanto, conforme os resultados obtidos no presente estudo, o efluente com concentração de 3,1% de KMnO_4 , parece não causar efeitos tóxicos sobre biodiversidade da comunidade aquática. Tal resultado reforça a idéia de que este composto pode ser altamente tóxico e causar prejuízo ao ecossistema aquático se utilizado de maneira indiscriminada como quimioterápico em sistema de cultivo.

6.3.2 *Pseudokirchneriella subcapitata*

A figura 21 representa os resultados do crescimento algáceo obtido nos ensaios realizados com permanganato de potássio (KMnO_4). É possível observar que ocorreu diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas, com exceção apenas para 3,1%. As concentrações de 3,1% e 6,2% correspondem aos valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado), respectivamente. No entanto, o cálculo destas concentrações é dependente das concentrações individuais utilizadas em testes, e não da curva derivada do conjunto dos resultados. Devido a isso, a utilização de CENO e CEO para a tomada de decisões ambientais pode ser considerada inadequada (CHAPMAN *et al.*, 1996; MARKLE *et al.*, 2000).

No presente trabalho foi utilizado o cálculo da concentração de inibição percentual (ICp), também conhecida como concentração efetiva (CE) da amostra que pode inibir o crescimento dos organismos em diferentes porcentagens. Em estudos realizados por

MARKLE *et al.* (2000), utilizando *Raphidocelis subcapitata* para a avaliação da toxicidade de efluentes, concluíram que ICp apresenta-se como uma ferramenta muito melhor para avaliar a sensibilidade de espécies quando comparada aos resultados obtidos em ensaios utilizando como resposta valores de CENO e CEO.

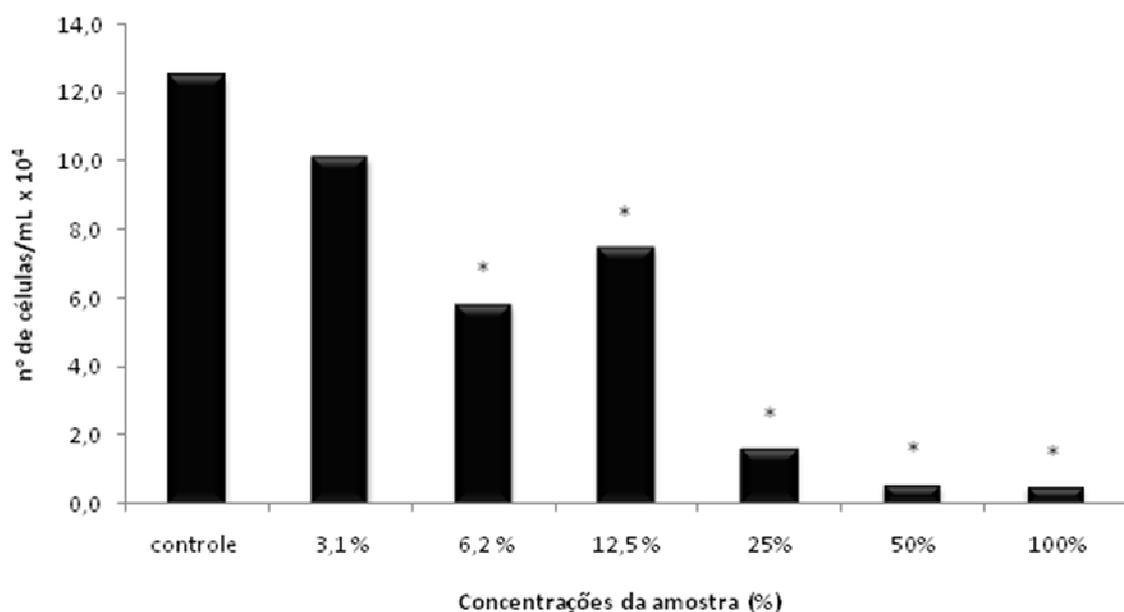


Figura 21 - Taxa de crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcaptata* exposta a diferentes diluições da concentração 4,0 mg.L⁻¹ de permanganato de potássio por 72 horas. Média de três ensaios. * diferença significativa (P<0,05).

A CE50 estimada para o permanganato de potássio neste estudo foi de 0,54 mg.L⁻¹, sendo que o intervalo de confiança (95%) situou-se entre 0,28 a 0,68 mg.L⁻¹ de KMnO₄. A bibliografia sobre testes de toxicidade com o permanganato de potássio não é vasta, e poucas são as chances de encontrar estudos que possam ser comparativos com este produto, pelo organismo-teste escolhido e pelo tipo de sistema aplicado. Existem trabalhos sobre a utilização deste composto como algicida, onde são descritos os procedimentos, a quantidade relativa da substância química requerida para prevenir o crescimento algal, as concentrações e os tempos de tratamentos para eliminar as algas.

Nos estudos realizados por FITZGERALD (1964), foi avaliado o uso do permanganato de potássio como potencial algicida em três espécies de algas, *Chorella pyrenoidosa*, *Phormidium inindatum* e *P. retzii*, e comparado com outras substâncias químicas representativas que são utilizadas como o mesmo propósito, dentre eles, o sulfato de cobre (CuSO_4), Armazide, Algimycin MT4. Os resultados indicaram que o permanganato de potássio nas concentrações de 5 a 10 ppm foi algicida e a concentração de 10 ppm foi letal para a espécie *C. pyrenoidosa* dentro de 6 horas de contato com o composto. Além disso, segundo o autor, os testes mostraram que o permanganato de potássio além de ser um agente algicida possui propriedades comparadas com o sulfato de cobre, uma vez que, após o tratamento com KMnO_4 , não houve recuperação do crescimento algal, mesmo com a remoção ou perda do produto químico pela dissipação com o meio de tratamento.

SMITH (2005) estudou a eficácia do permanganato de potássio na redução da toxicidade da alga *Prymnesium parvum* sobre os peixes. Os resultados sugeriram que a concentração mínima de 2 mg.L^{-1} de permanganato de potássio pode ser usado para erradicar a alga *P. parvum*, sem produzir toxicidade aos peixes. DORZAB e BARKOH (2005) verificaram que a concentração de 4 mg.L^{-1} de KMnO_4 foi eficaz no combate a alga *P. parvum* e na eliminação da toxicidade da alga em *Oncorhynchus mykiss*, com sobrevivência de 80% dos peixes.

Entretanto, as concentrações recomendadas para o uso deste composto tanto para o tratamento de doenças de peixes que é de 1 a 4 mg.L^{-1} (FRANCIS-FLOYD e KLINGER, 1997; PAVANELLI *et al.*, 2002), quanto para algicida de 2 e 4 mg.L^{-1} (SMITH, 2005; DORZAB e BARKOH, 2005), foram altamente tóxicas para *P. subcapitata*. É possível observar na figura 21, que tais concentrações causaram inibição acentuada do crescimento algal, apresentando típica relação dose-resposta, quanto maior a concentração do produto na água, menor a taxa de crescimento da alga *P. subcapitata*. Tais resultados sugerem que a

aplicação do permanganato de potássio na aquicultura pode atingir ou prejudicar não somente organismos não alvo, como fitoplâncton, zooplâncton e peixes, mas também comprometer todo ecossistema nele inserido.

O CE50 encontrado ($0,54 \text{ mg.L}^{-1}$) para *P. subcapitata* neste estudo, bem abaixo do valor das concentrações que são consideradas seguras para o uso do permanganato de potássio em banhos de longa duração para peixes e de propriedade algicida, mostra o quanto este composto pode comprometer a biodiversidade do sistema aquático. Como espécies representativas do nível trófico inferior, as algas são organismos ecologicamente importantes, pois, ocupam uma posição única entre os produtores primários (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004), e o prejuízo a estes organismos pode causar modificações na diversidade e abundância de espécies em outros níveis da cadeia trófica. Outro aspecto importante é que, de um modo geral, na aquicultura, os efluentes de viveiros em que se aplicaram produtos químicos são despejados no ecossistema receptor sem qualquer tratamento (SCHALCH, 2007). De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, o efluente com permanganato de potássio teria que apresentar uma concentração de apenas 3,1% para não causar efeitos tóxicos sobre biodiversidade da comunidade aquática.

7 CONCLUSÕES

- O valor de CL₅₀;96h (1,81 mg.L⁻¹) aqui estimado, abaixo do que é considerado seguro em outros trabalhos para o tratamento e controle de parasitos, sugere que esta espécie de peixe, nesta fase de desenvolvimento, apresenta alta sensibilidade ao composto.
- Os resultados das variáveis hematológicas e atividade fagocítica de macrófagos demonstraram que a exposição ao permanganato de potássio em tilápia causa supressão do sistema imune, a partir de concentrações de 1,0 mg.L⁻¹;
- Na avaliação bioquímica, o aumento nos níveis de GSH, indica reposta adaptativa e de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo permanganato de potássio;
- A contagem de micronúcleos mostrou não ser biomarcador adequado para detectar a ação genotóxica do permanganato de potássio;
- Os testes ecotoxicológicos com *C. dubia* e com a microalga *P. subcapitata*, mostraram que o KMnO₄ causou toxicidade para aos dois organismos-teste, sugerindo que este composto pode agir negativamente sobre espécies de diferentes níveis da cadeia trófica.

8 REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustácea, Cladocera)**, São Paulo, 2005. 15p.
- ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 58, p. 220–226, 2004.
- AJANI, F.; OLUKUNLE, O.A.; AGBEDE, S.A. Hormonal and haematological responses of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) to nitrite toxicity. *Journal of Fisheries International*, v. 2, p. 48-53, 2007.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. 60-68, 2005.
- ANDRADE, R.L.B.; ANDRADE, L.S.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebetes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 27, p. 523-528, 2005.
- ANDREIKĖNAITĖ, L.; BARDIENĖ, J.; VOSYLIENĖ, M.Z. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture road maintenance salts. *Acta Zoologica Lituanica*, v. 17, p. 213-219, 2007.
- APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the examination of Water and Wastewater**, 21^o ed. Washington, D.C: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation, 2005. 1085 p.
- ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, p. 1825–1835, 2000.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; BOZZO, F.R.; MORAES, F.R. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from valley of Tijucas rivers, SC, Brazil. *Scientia Agricola*, v. 63, p. 115-120, 2006.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, v. 109, p. 33–44, 2000.
- BAKIREL, T.; KELES, O.; KARATAS, S.; OZCAN, M.; TURKMEN, G.; CANDAN, A. Effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 71, p. 175-181, 2005.
- BANAEE, M.; MIRVAGEFEI, A.R.; RAFEI, G.R.; MAJAZI A.B. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal Environmental Research*, v. 22, p. 189-198, 2008.
- BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de Vitamina C e Ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 2149-2156, 2002.

- BASHEERA-JOHN, M.; CHANDRAN, M.R.; ARUNA, B.V.; ANBARASU, K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 12, p. 201–207, 2002.
- BENDICH, A.; MACHLIN, L. J. Safety of oral intake of vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 48, p. 612-619, 1988.
- BENNANI, N.; SCHMID-ALLIANA, A.; LAFAURIE, M. Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 5, p. 237-246, 1995.
- BILLS, T.D.; MARKING, L.L.; HOWE, G.E. Sensitivity of juvenile striped bass to chemicals used in aquaculture. Resource publication 192, U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., USA, 1993.
- BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 25, p. 853-873, 2001.
- BOYD, C.E. **Water quality management for pond fish culture**. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1982. 318p.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, v. 36, p. 357 – 364, 2006.
- CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research*, v. 438, p. 155–161, 1999.
- CARLSON, E.; ZELIKOFF, J.T. The Immune System of Fish: A Target Organ of Toxicity, pp. 489-530. In: Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E. (eds.), **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2008. p. 489-530.
- CARNEIRO, D.O.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA-JÚNIOR, D.J.; LEAL, C.A.G.; LOGATO, P.V.R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p. 869-876, 2007.
- CARNEIRO, P.C.F.; SCHORER, M.; MIKOS, J.D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasito *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, p. 99-102, 2005.
- CARRASCO K.R.; TILBURY K.L.; MYERS M.S. Assesment of the piscine micronucleus tes as na in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Science*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- CARVALHO, S.; RANZANI PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; DIAS, D. C.; FRANÇA, J.G. Determinação do tempo de incubação de leveduras em *Oreochormis niloticus* para estudos da atividade fagocítica. In: **X Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos**, Buzios: Caderno de Resumos, 2008a.
- CARVALHO, S.; RANZANI PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; DELBON, M.C., DONOSO, F.P. Toxicidade do sulfato de cobre (CuSO₄), durante a exposição e depuração sobre o sistema imune da tilápia, *Oreochromis niloticus*. In: **Aquaciênica 2008**, Maringá: Caderno de Resumos, 2008b.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

- ÇAVAŞ, T.; GARANKO, N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 569–574, 2005.
- ÇAVAŞ, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, v. 22, p. 263–268, 2007.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo, **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes e organismos aquáticos**, São Paulo, 2002. 27p.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Considerações preliminares sobre toxicidade aos organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 1990. 11p.
- CHAPMAN, P.M.; CALDWELL, R.S.; CHAPMAN, P.F. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, p. 77-79, 1996.
- CHEN, C.Y.; WOOSTER, G.A.; GETCHELL, R.G.; BOWSER, P.R.; TIMMONS, M.B. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, v. 218, p. 89-102, 2003.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, v. 50, p. 550–552, 1944.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 2005 *Resolução nº 357, de 17 de março de 2005*. Diário Oficial da União. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2006. 23p.
- CRESPO, F.J.; CRESPO, F.R.; VELARDE, I.F.; MONTENEGRO, V.Y.; PELAEZ, C.V. Evaluation of chemotherapeutic agents against cichlidogyriasis in tilapia (*Oreochromis hornorum*) in México. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 37, p. 179-187, 1995.
- CRUZ, C.; GOMES, G.R.; VENTURINI, F.P.; GUILHERME, P.E.; CARRASCHI, S.P.; SHIOGIRI, N.S.; DUÓ, D.A.; FUJIMOTO, R.Y. Toxicidade aguda do permanganato de potássio e da oxitetraciclina para o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*) utilizado como bioindicador. *O Biológico*, v. 68, 332/382, 2006.
- DANAYADOL, Y.; KRAJAIWONG, V. RUANGPAN, L. Proceedings of the 37 th Kasetsart University Annual Conference, May, 1999. p. 175-179.
- DARWISH, A.M.; GRIFFIN, D.L.; STRAUS, D.L.; MITCHELL, A.J. Histological and hematological evaluation of potassim permanganate exposure in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 14, p. 134-144, 2002.
- DEEDS, J.R.; TERLIZZI, D.E.; ADOLF, J.E.; STOECKER, D.K.; PLACE, A.R. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (=Gyrodinium galatheanum) (Dinophyceae) – a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae*, v. 1, p. 169-189, 2002.
- DICK, P.T.; DIXON, D.G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology*, v. 26, p. 475-481, 1985.

- DORZAB, T.; BARKOH, A. Toxicity of copper sulfate and potassium permanganate to rainbow trout and golden alga *Prymnesium parvum*. In: Barkoh, A.; Fries, L.T. **Management of *Prymnesium parvum* at Texas State Fish Hatcheries**, Management Data Series N°. 236, 2005.
- DUNCAN, T.O. **A Review of Literature on the Use of Potassium Permanganate (KMnO₄) in Fisheries**. US Fish and Wildlife Service, Report FWS-LR-74-14, 1974. 61p.
- DUREZA, L.A. **Toxicity and lesions in the gills of *Tilapia nilotica* fry and fingerlings exposed to formalin, furanace, potassium permanganate and malachite green**. Doctoral Dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, USA, 1988.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidance, Manual Alternative Disinfectants and Oxidants. Chapter 5 Potassium Permanganate, 1999, p. 5-12.
- FAROMBI, E.O.; ADELOWO, O.A.; AJIMOKO, Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 4, p. 158-165, 2007.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 534, p. 65-75, 2003.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 103-107, 2004.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FILIPAK-NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; NAKAO, L.S. RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 1705-1713, 2008.
- FITZGERALD, G.P. Evaluation permanganate as an algicide for water cooling towers. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, v. 3, p. 82-85, 1964.
- FOURNIER, D.; BRIDE, J.M.; POIRIE, M.; BERGE, J.B.; PLAPP, F.W. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. *Journal Biology Chemistry*, v. 267, p. 1840-1845, 1992.
- FOURNIER, M.; CYR, D.; BLAKLEY, B.; BOERMANS, H.; BROUSSEAU, P. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *American Zoology*, v. 40, p. 412-420, 2000.
- FRANCIS-FLOYD, R.; KLINGER, R. **Use of potassium permanganate to control external infections of ornamental fish**. University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences Extension Fact Sheet FA-37, 1997.

- GABRIEL, U.U.; AMAKIRIAND, E.U.; EZERI, G.N.O. Haematology and gill pathology of *Clarias gariepinus* exposed to refined petroleum oil, kerosene under laboratory conditions. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 63, p. 461-465, 2007.
- GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZ-JAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNÁNDEZ-CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 23, p. 760-769, 2007.
- GIRÓN-PÉREZ, M.I.; MONTES-LÓPEZ, M.; GARCÍA-RAMIREZ, L.A.; ROMERO-BAÑUELOS, C.A.; ROBLEDO-MARENCO, M.L. Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on phagocytic and hematological parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, p. 266–269, 2008.
- GIULIO, R.T.D.; MEYER, J.N. Reactive Oxygen Species and Oxidative stress. **In:** GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2008. p. 273-326.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal Clinical Pathology*, v. 56, p. 50–59, 1971.
- GRIFFIN, B.R.; DAVIS, K.B.; DARWISH, A.; STRAUS, D.L. Effect of exposure to potassium permanganate on stress indicators in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 33, p. 1-9, 2002.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? *Free Radical Research*, v. 25, p. 439–454, 1996.
- HALLIWELL, B. Tell me about free radicals, doctor: review. *Journal of the Society of Medicine*, v. 82, p. 747-752, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals other reactive species and disease. **In:** HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C., editors. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, Clarendon Press, 1999. p. 617-783.
- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, v. 11, p. 714-719, 1977.
- HARFORD, A.J.; O'HALLORAN, K.; WRIGHT, P.F.A. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 20, p. 562-573, 2005.
- HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F., SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D., VANPRAYS, P.H.; MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 18, p. 277-291, 1991.
- HOBBS M.S.; GRIPPO R.S.; FARRIS J.L.; GRIFFIN B.R.; HARDING L.L. Comparative acute toxicity of potassium permanganate to nontarget aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, p. 3046-3052, 2006.
- HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTTSSON, B.E; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications

for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 38, p. 255-266, 2003.

- HUGHES, J.S. Tolerance of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), larvae and fingerlings to nine chemicals used in pond culture. *Proceedings of the 24th Annual Conference, Southeastern Association of Game and Fish Commissioners*, v. 24, p. 431-438, 1971.
- INTORRE, L.; MEUCCI, V.; Di BELLO, D.; MONNI, G.; SOLDANI, G.; PRETTI, C. Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 231, p. 590-595, 2007.
- ISO. Water Quality—Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae. International Standardisation Organization, Brussels (ISO 8692), 2004.
- JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, p. 680-693, 2008.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; KOSAI, P.; SAHAPHONG, S.; KIRTPUTRA, P.; CHAWLAB, J.; CHARUCHAROEN, S. Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. *Research Journal of Environmental Sciences*, v. 1, p. 56-63, 2007.
- JONSSON, C.M.; FERRACINI, V.L.; PARAIBA, L.C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S.R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. *Scientia Agricola*, v. 59, p. 441-446, 2002.
- JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto*, v. 31, p. 434-449, 1998.
- KALLQUIST, T.; MILACIC, R.; SMITAL, T.; THOMAS, K.V.; VRANES, S.; TOLLEFSEN, K.E. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research*, v. 42, p. 2146-2156, 2008.
- KLEIN, S.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; REIDEL, A.; SIGNOR, A; SIGNOR, A.A. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguaçu *Steindachneridion sp.*, Garavello (1991). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, p. 51-58, 2004.
- KORI-SIAKPERE, O. Acute toxicity of potassium permanganate to fingerlings of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 2514-2520, 2008.
- LATIF, M.; LICEK, E. Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbiotests. *Environmental Toxicology*, v. 19, p. 302-309, 2004.
- LAWRENCE, J.M. Preliminary results on the use of potassium permanganate to counteract the effects of rotenone on fish. *Progressive Fish Culturist*, v. 18, p. 15-21, 1956.
- LIMA, P.L.; BENASSI, J.C.; PEDROSA, R.C.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, T.B.; WILHELM FILHO, D. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, v. 50, p. 23-30, 2006.

- LIU, J.S.; CHEN, J.S.; YU, Z.Y. The effect of common fungicides on Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* eggs. *Journal World Aquaculture Society*, v. 26, p. 84-87, 1995.
- LOMBARDI, J.L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, 2004. p. 263-272.
- LU, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal*, v. 13, p. 1169–1183, 1999.
- MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, v.1, p. 441-445, 1987.
- MADUENHO, L.P. e MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 148, p. 265–272, 2008.
- MARKING, L.L.; BILLS, T.D. Toxicity of potassium permanganate to fish and its effectiveness for detoxifying antimycin. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 104, p. 579-581, 1975.
- MARKING, L.L.; RACH, J.J.; SCHREIER, T.M. American Fisheries Society Evaluation of Antifungal Agents for Fish Culture. *The Progressive Fish-Culturist*, v. 56, p. 225–231, 1994.
- MARKLE, P.J.; GULLY, J.R.; BAIRD, R.B.; NAKADA, K.M.; BOTTOMLEY, J.P. Effects of several variables on whole effluent toxicity test performance and interpretation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, p. 123-132, 2000.
- MARRARA, A.C.T.; SIVIERO, A.R.. Avaliação ecotoxicológica e físico-química da água superficial do Ribeirão Tatu no município de Limeira-SP. *O Biológico*, v. 68, p. 324/196, 2006.
- MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemical Physiology*, v. 133, p. 151-160, 2002.
- MARTÍNEZ-ÁLVARES, R.M.; MORALES, A.E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 15, p. 75–88, 2005.
- MARTINS, M.L. (2004). Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na Aqüicultura Brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, 2004. p. 357-370.
- MARTINS, M.L. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes**. Jaboticabal, SP: UNESP: FUNEP, il. Boletim Técnico, 1997. p. 58.
- MATSUMOTO, F.E.; CÓLUS, M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 489-492, 2000.
- MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carragenin in the swim bladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 33, p. 5-10, 1996.
- MAXIMIANO, A.A.; FERNANDES, R.O.; NUNES, F.P.; ASSIS, M.P., MATOS, R.V.; BARBOSA, C.G.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações

- sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.10, p. 483-491, 2005.
- MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, p. 621-631, 2002.
- MELENDRE, P.M.; CELADA, J.D.; CARRAL, J.M.; SÁEZ-ROYUELA, M.; AGUILERA, A. Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). *Aquaculture*, v. 257, p. 257-265, 2006.
- MOREIRA-SANTOS, M.; AMADEU, M.V.M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 59, p. 164-173, 2004.
- MORON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R. F.; RIBAS, J. L. C.; TAKAHASHI, H. K. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida Atrazina. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, p. 27-30, 2006.
- NAIDU, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. *Nutrition Journal*, v. 2, p. 1-10, 2003.
- NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANO, M.A.; CENTENO, A.J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 293-297, 1997.
- NORBERG – KING, T.J. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Centre. Technical Report 03-93. Duluth, M.N., 1993. p. 13.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- O'HALLORAN, K.; AHOKAS, J.T.; WRIGHT, P.F.A. The adverse effects of aquatic contaminants on fish immune responses. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, v. 4, p. 9-28, 1998.
- OKUMURA, M.P.M. (2005). Uso de medicamentos em piscicultura. <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xmp0003.htm>> Acesso em: 03 de mar. de 2009.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; PELLETIER, E. Hematological finding in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research*, v. 101, p. 74-80, 2006.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; PFEIFFER, W.C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 34, p. 190-195, 1996.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da Aquicultura brasileira e Mundial.. In: VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. **Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p. 354 – 381.
- OZCAN ORUC, E.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemical Physiology Part C*, v. 137, p. 43-51, 2004.

- PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environment International*, v. 28, p. 285–293, 2002.
- PALHARES, D.; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, p. 281-284, 2002.
- PANDEY, A.K.; GEORGE, K.C.; MOHAMED, M.P. Histopathological changes induced in gill of in estuarine mullet, *Liza parsia*, by sublethal exposure to mercuric chloride. *Indian Journal of Fisheries*, v. 43, p. 285-291, 1996.
- PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment*, v. 309, p. 105–115, 2003.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia diagnóstico e tratamento**. Maringá. EDUEM, 2002. 305 p.
- PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELBERG E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, v. 97, p. 287–292, 2005.
- POULSEN, H.E. Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 57, p. 161-169, 2005.
- PRESS, C.McL.; EVERSEN, Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 9, p. 309–318, 1999.
- RAND, G.M. Fish toxicity studies. In: GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2008. p. 659-682.
- RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington, Publinshing. Hemisphere, 1985. 665 p.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Características hematológicas de tainha, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (Lat. 25000'S – Long. 47055'W). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 22, p. 1-22, 1995.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; EIRAS, A.C. Células sanguíneas e contagem diferencial dos leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná – PR. *SIMBRAq*, 7 ENBRAPOA, 2., ANAIS, 1992. p.173-181.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. (2004). Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, 2004. p. 89-120.
- REARDON, I.S; HARRELL, L.W. Effects of varying salinities on the toxicity of potassium permanganate to larval and juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture and Fisheries Management*, v. 25, p. 571-578, 1994.
- REGOLI, F.; NIGRO, M; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 75, p. 43-52, 2005.

- RÉNDON-VON OSTEN, J.; ORTÍZ-ARANA, A.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatanana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, v. 58, p. 627-636, 2005.
- RODGHER, S.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G. Evaluation onto life parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Article in Press, 2009.
- RODRIGUES, E.L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PACHECO, F.J. VEIGA, M.L.; EIRAS, A.C. Efeito agudo do organofosforado Dipterox 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, p. 197-203, 1997.
- RODRIGUES, L.H.R.; ARENZON, A.; RODRIGUEZ, M.T.R.; FONTOURA, N.F. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. *Biociências*, v. 11, p. 137-144, 2003.
- ROMANELLI, M.F.; SILVA, G.P.; BORRELY, S.I. Redução da toxicidade do surfactante LAS tratado com o feixe de elétrons. *Journal Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, p. 103-107, 2006.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para a hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 20, p. 329-334, 1947.
- ROUGIER, F.; TROUTAND, D.; NDOYE, A.; DESCHAUX, P. Non-specific immune response of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 4, p. 115-127, 1994.
- SAN'TANNA, C. L.; AZEVEDO, M.T.P. Uma ameaça à qualidade da água. *Pesquisa Fapesp*, v. 53, p. 28-30, 2000.
- SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J.M.; AÏT-AÏSSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, p. 177-183, 2005.
- SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; AYLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of Micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p. 139-143, 2001.
- SARDER, M.R.I.; THOMPSON, K.D.; PENMAN, D.J.; McANDREW, B.J. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 25, p. 37-46, 2001.
- SCHALCH, S.H.C. A necessidade da regulamentação de produtos químicos utilizados na aquicultura brasileira. 2007. Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em: 03 de mar de 2009.
- SCHIMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SCHLENK, D.; COLLEY, W.C.; ALFY, A.E.; KIRBY, R.; GRIFFIN, B.R. Effects of the Oxidant Potassium Permanganate on the Expression of Gill Metallothionein mRNA and Its Relationship to Sublethal Whole Animal Endpoints in Channel Catfish. *Toxicological Sciences*, v. 54, p. 177-182, 2000.

- SHAH, S.L.; ALTINDAÚ, A. Alterations in the immunological parameters of Tench (*Tinca tinca* L. 1758) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal treatments with mercury, cadmium and lead. *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, v. 29, p. 1163-1168, 2005.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, p. 1315S – 1321S, 1995.
- SILVA, A.L.F.; CHAGAS, E.C.; GOMES, L.C.; ARAUJO, L.D.; SILVA, C.R.; BRANDÃO, F.R. Toxicity and sublethal effects of potassium permanganate in Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 37, p. 318-321, 2006.
- SILVA, C.A. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná.** UFPR, 2007, 67 p. Dissertação (Mestrado), Curitiba, 2007.
- SILVA, J.R.M.C., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S., JENSCH-JUNIOR B.E. Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, v. 28, p. 326-328, 2005.
- SILVA, J.R.M.C., STAINES, N.A., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology*, v. 60, p. 466-478, 2002.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. e ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Rima/FAPESP, São Carlos, 2001. 106p.
- SMITH, D.G. Efficacy of potassium permanganate to reduce *Prymnesium parvum* ichthyotoxicity. *In: BARKOH, A.; FRIES, L.T. Management of Prymnesium parvum at Texas State Fish Hatcheries*, Management Data Series N°. 236, 2005.
- SOUZA, M.L.R. Industrialização, Comercialização e perspectivas. *In: MOREIRA, H.L.M, VARGAS, L., RIBEIRO, R.P, ZIMMERMANN, S. Fundamentos da Moderna Aquicultura*, Editora ULBRA, Canoas, 2001. p. 149-186.
- SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, v. 605, p. 87-93, 2006.
- STRAUS, D.L. Comparison of the acute toxicity of potassium permanganate to Hybrid Striped Bass in well water and diluted well water. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 35, p. 55-60, 2004.
- STRAUS, D.L.; GRIFFIN B.R. Efficacy of potassium permanganate in treating Ichthyophthiriasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 14, p. 145-148, 2002.
- SVOBODA, M.; LUSKOVA, V.; DRASTICHOVA, J.; ILABEK, V. The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. BRNO*, v. 70, p. 457-465, 2001.
- SVOBODOVA, Z.; LUSKOVA, V.; DRASTICHOVA, J.; SVOBODA, M.; ZILABEK, V. Effect of Deltamethrin on Haematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. BRNO*, v. 72, p. 79-85, 2003.

- TAKENAKA, R.A.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; ROCHA, O. Toxicidade de extratos de florações de cianobactérias de Reservatórios do Rio Tietê, SP, aos Dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). *Journal Brazilian Society Ecotoxicology*, v. 2, p. 147-156, 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scientiarum*, v. 24, p. 547-554, 2002.
- THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A.E. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *Journal of Fish Diseases*, v. 27, p. 23-28, 2004.
- TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: Análise de dois ecossistemas catarinenses**. UFSC, 2008, 70 p. Monografia (Bacharelado), Florianópolis, 2008.
- UMEDA, N.; NIBE, H.; HARA, T.; HIRAZAWA, N. Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyus anguillae* and *Pseudodactylogyus bini*. *Aquaculture*, v. 253, p. 148–153, 2006.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA 600/7-91-002, Washington, DC, 1994.
- VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, p. 42–51, 2008.
- VENTURA-LIMA; J.; CASTRO, M.R.; ACOSTA, D.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; CARVALHO, L.M.; BOHRER, D.; BARROS, D.M.; MARINS, L.F.F.; SILVA, R.S.; BONAN, C.D.; MONSERRAT, J.M. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 149, p. 538–543, 2009.
- VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, p. 139-145, 2004.
- WEEKS, B.A.; ANDERSON, D.P.; DUFOUR, A.P.; FAIRBROTHER, A.; GOVEN, A.J.; LAHVIS, G.P. & PETERS, G. 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress, In: HUGGETT, R.J., KIMERLY, R.A., MEHRLE, P.M., Jr. BERGMAN, H.L. (eds.), **Biomarkers: Biochemical, physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, Chelsea, MI. USA, 1992. p 221-234.
- WELLBORN, T.L.J. The toxicity of nine therapeutic and herbicidal compounds to striped bass. *The progressive Fish Culturist*, v. 31, p. 27-32, 1969.
- WEST, I.N.C.; GULLEY, D. TOXTAT 3.5. University of Wyoming, USA, 1996. 38p.
- WINSTON, G.W.; DIGIULIO, R.T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *Aquatic Toxicology*, v. 19, p. 137-161, 1991.

- WINSTON, G.W.; LIVINGSTONE, D.R.; LIPS, F. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Zoology*, v. 255, p. 296–308, 1990.
- WINTROBE, M.M. Variation in the science and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, v. 51, p. 32-49, 1934.
- WRIGTH, D.A.; WELBOURN, P. *Environmental Toxicology*, Cambridge University Press, 2002, 657 p.
- ZELIKOFF, J.T.; RAYMOND, A.; CARLSON, E.; LI, Y.; BEAMAN, J.R.; ANDERSON, M. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicology Letters*, v. 112–113, p. 325–331, 2000.
- ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, v. 55, p. 167–174, 2004.
- ZOLL-MOREUX, C.; FERRIER, V. The jaylet test (Newt micronucleus test) and the micronucleus test in *Xenopus*: Two in vivo tests on amphibian evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of fish effluents. *Water Research*, v. 33, p. 2301-2314, 1999.

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](#)