

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

Toxicidade do sulfato de cobre para a tilápia, *Oreochromis niloticus* e teste ecotoxicológico com *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*

Aluna: Solange de Carvalho

Orientadora: Prof. Dra. Maria José T. Ranzani de Paiva

Co-orientador: Prof. Dr. Julio Vicente Lombardi

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

Toxicidade do sulfato de cobre para a tilápia, *Oreochromis niloticus* e teste ecotoxicológico com *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*

Aluna: Solange de Carvalho

Orientadora: Prof. Dra. Maria José T. R. de Paiva

Co-orientador: Prof. Dr. Julio Vicente Lombardi

C331t Carvalho, Solange de
Toxicidade do sulfato de cobre para a tilápia *Oreochromis niloticus*
e teste ecotoxicológico com *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella*
subcapitata / Solange de Carvalho. – – Jaboticabal, 2009
ix, 103 f. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura, 2009

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Banca examinadora: José Roberto Ferreira, Monica Accaui

Marcondes Moura, Fabiana Pilarski, Claudinei da Cruz

Bibliografia

1. Toxicidade. 2. Sulfato de cobre. 3. Biomarcadores. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.09

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 DO SULFATO DE COBRE PARA A TILÁPIA, *Oreochromis niloticus* E
TESTE ECOTOXICOLÓGICO COM *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella*
subcapitata.

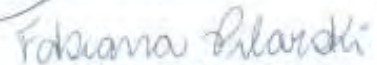
AUTORA: SOLANGE DE CARVALHO


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


Prof. Dr. JOSE ROBERTO FERREIRA
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA/USP/PIRACICABA, SP


Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP


Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ
Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia NEPEAM/FCAV/UNESP -
JABOTICABAL, SP


Profa. Dra. MÔNICA ACCAUI MARCONDES DE MOURA E MELLO
Centro Experimental Central / Instituto Biológico

Data da realização: 30 de julho de 2009.

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais chegou ao entendimento humano, o que Deus tem preparado para aqueles que o amam”.

(I Coríntios 2:7-9)

A Deus em primeiro lugar, sempre guiando meus passos, ao meu pai, Edson, (in memoriam), ainda sigo os seus ensinamentos, a minha mãe, Maria, pelo apoio e amor e ao Vagner, o doce amor da minha vida, dedico este trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a professora e orientadora Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva e ao pesquisador e co-orientador Dr. Julio Vicente Lombardi, pelos ensinamentos, paciência, apoio e amizade, durante a realização desse trabalho.

Ao Dr. Ciro Oliveira Ribeiro, por possibilitar o uso da estrutura do laboratório de Toxicologia Aquática e Morte Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba.

Ao Dr. Francisco Fillipak Neto e a Danielle Dietrich pela ajuda nas análises bioquímicas e histopatológicas

Ao Dr. Ciro Oliveira Ribeiro pela ajuda nas leituras das lâminas de histopatologia

Ao Prof. Adilson Curtis e Ms Luciano Tormem do Laboratório de Espectrometria Atômica da Universidade Federal de Santa Catarina pela determinação de cobre nas amostras de tecido

Ao Dr. Amauri Menega do Centro de Estudos Ambientais da Unesp-Rio Claro pela determinação de cobre nas amostras de água.

A Secretária da pós-graduação do Caunesp Veralice Capatto tão solícita em todos os momentos.

Ao Instituto de Pesca por ter possibilitado a realização deste trabalho, através da utilização da sua estrutura.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) pela oportunidade de realização do curso.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, Processo Fapesp nº 06/50281-2

Ao Setor de piscicultura do Pólo Regional de Desenvolvimento da Pesquisa agropecuária do Vale do Ribeira em Pariquera-açu pelo fornecimento dos peixes.

Aos colegas do Instituto de Pesca, Fernanda, Nat, Marina, Dani, Patrícia, João pela ajuda e convívio.

Ao Luis, técnico do laboratório do Instituto de Pesca pelas análises de água realizadas.

A Jakeline Galvão de França, pela amizade incondicional e carinho.

A tia Isabel e tio João pelo amor e carinho em todos os momentos e por terem me acolhido em sua casa.

As minhas primas e amigas Priscila e Silvana, pela amizade e companheirismo.

Aos pesquisadores e funcionários do Instituto de Pesca pela amizade e convívio.

A todos os pesquisadores e colegas do CAUNESP pela convivência.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Cobre	17
2.2 Sulfato de cobre e aquicultura	20
2.3 Organismos-teste	23
2.3.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	23
2.3.2 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	24
2.3.3 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	25
2.4 Bioacumulação.....	26
2.5 Biomarcadores de contaminação aquática	27
2.5.1 Hematologia	29
2.5.2 Imunologia	29
2.5.3 Análises Bioquímicas.....	31
2.5.4 Histopatologia.....	33
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Ensaio I- Exposição	35
4.2 Ensaio I- Recuperação	36
4.3 Determinações de cobre.....	37
4.2.1 Água.....	37
4.2.2 Peixes	38
4.4 Análises hematológicas	39
4.5 Análises imunológicas	40
4.6 Análises bioquímicas.....	43
4.5.1 Determinação da concentração de proteína total.....	43
4.5.2 Atividade enzimática da GST	43
4.5.3 Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	44
4.5.4 Atividade Enzimática da catalase (CAT).....	44

4.5.5 Peroxidação Lipídica (LPO).....	45
4.7 Análises histopatológicas	45
4.8 Ensaio ecotoxicológicos	46
4.8.1 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	46
4.8.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	49
4.9 Análises estatísticas	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Variáveis físicas e químicas da água dos ensaios I e II	52
5.2 Determinações de cobre.....	53
5.3 Análises Hematológicas.....	60
5.4 Análises Imunológicas.....	67
5.5 Análises Bioquímicas	73
5.6 Análises Histopatológicas	81
5.6.1 Brânquias	81
5.6.2 Fígado	87
5.6.3 Pâncreas	87
5.7. Ensaio Ecotoxicológicos.....	91
5.7.1 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	91
5.7.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	94
6. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Hierarquia biológica e respostas a poluentes.....	15
Figura 2- Vista do experimento realizado com <i>O. niloticus</i>	24
Figura 3- Análises hematológicas	27
Figura 4- Análises imunológicas	29
Figura 5- Curva de crescimento algáceo	34
Figura 6- Vista do experimento com a alga <i>P.subcapitata</i>	36
Figura 7- Vista do experimento com <i>C. dubia</i>	38
Figura 8- Concentrações de cobre em tecidos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I.....	42
Figura 9- Concentrações de cobre em tecidos de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	43
Figura 10- Parâmetros hematológicos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I.....	48
Figura 11- Parâmetros hematológicos de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	50
Figura 12- Contagem total e diferencial de leucócitos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I	52
Figura 13- Contagem total e diferencial de leucócitos de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	53
Figura 14- Contagem total de trombócitos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II	54
Figura 15- Capacidade fagocítica de macrófagos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I	56
Figura 16- Capacidade fagocítica de macrófagos de <i>O. niloticus</i> no ensaio II	56
Figura 17- Índice fagocítico de macrófagos de <i>O. niloticus</i> no ensaio I	59
Figura 18- Índice fagocítico de macrófagos de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	60
Figura 19- Atividade específica das GST em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio I.....	61
Figura 20- Atividade específica das GST em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio II	61
Figura 21- Concentração de GSH em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio I	63
Figura 22- Concentração de GSH em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	63
Figura 23- Atividade específica da catalase em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio I.....	66
Figura 24- Atividade específica da catalase em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio II	66
Figura 25- Peroxidação de lipídeos em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio I	67
Figura 26- Peroxidação de lipídeos em fígado de <i>O. niloticus</i> no ensaio II.....	68
Figura 27- Brânquias de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	69
Figura 28- Brânquias de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	71

Figura 29- Brânquias de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	72
Figura 30- Pâncreas de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	76
Figura 31- Pâncreas de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	77
Figura 32- Pâncreas de <i>O. niloticus</i> no ensaio I e II.....	78
Figura 33- Taxa de crescimento da alga <i>P. subcaptata</i> expostas ao CuSO₄.....	79

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis físico-químicas da água do ensaio I e ensaio II com <i>O. niloticus</i>	39
Tabela 2- Variáveis físico-químicas da água do ensaio I e ensaio II com <i>O. niloticus</i>	40
Figura 3- Concentração de cobre na água nos ensaios I e II com <i>O. niloticus</i>	41

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito sub-letal do sulfato de cobre para a tilápia, na concentração de 0,5 e 2,0 mg.L⁻¹ durante exposição e recuperação e determinar a toxicidade aguda para *Ceriodaphnia dubia* e para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Foram realizados dois ensaios (ensaios I e II) utilizando jovens de tilápia com peso médio de 38,29 g. Determinou-se neste estudo as concentrações de cobre nas brânquias, fígado e músculo dos animais, foram feitas também análises hematológicas, imunológicas, bioquímicas e histopatológicas durante exposição ao sulfato de cobre e posterior recuperação. Para o teste de toxicidade com *C. dubia* e *P. subcapitata* foram utilizadas as mesmas concentrações de sulfato de cobre do ensaio com peixes. Os cladóceros e as algas foram expostos a diluições dessas concentrações durante sete e três dias, respectivamente. Para a *C. dubia* observou-se a mortalidade e o efeito sobre a reprodução dos mesmos. Já para as algas foi observado o efeito inibitório sobre a taxa de crescimento. A exposição ao cobre no ensaio I e II resultou em acúmulo significativo de cobre nos tecidos analisados, com exceção do músculo. E no período de recuperação os valores de cobre permaneceram altos. O sulfato de cobre não provocou alterações hematológicas. Por outro lado, causou diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos de peixes expostos à concentração de 2,0mg.L⁻¹ de CuSO₄ no ensaio I. O cobre também causou diminuição da concentração de GSH. Com relação às análises histopatológicas houve alteração nas brânquias e hepatopâncreas em ambos os ensaios. Os resultados do teste ecotoxicológico com *C. dubia* e *P. subcapitata* mostrou que o sulfato de cobre causou toxicidade aguda para estes organismos. O uso desse produto na aquicultura pode comprometer o cultivo, uma vez que ocorreram danos a saúde dos peixes. Além disso a liberação de efluentes contendo resíduos desse composto pode causar danos ao ecossistema em que é lançado.

Palavras-chave: efeito sub-letal, peixes, algas, cladóceros, biomarcadores

ABSTRACT

The copper sulphate is one of the most widely used chemicals for the control of parasites and for the control of phytoplankton in aquaculture. The purpose of this study was to evaluate sublethal effects of concentrations of copper sulphate on tilapia. In addition, ecotoxicity of this compound was determined for microcrustaceans *Ceriodaphnia dubia* and the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. The biomarkers evaluated in this study were copper bioaccumulation in tissues, hematological, immunological, biochemical and histopathological parameters. The copper toxicity for microcrustacean *C. dubia*, was evaluated with acute tests through mortality. The exposure to copper in the experiments I and II resulted in significant accumulation of copper in the tissues, except for the muscle. In the recovery period, the copper values remained high in all tissues. The haematological parameters were not affected by the copper sulphate. However, was observed in experiment I a significant change in the phagocytic capacity of macrophages in fish exposed to concentration 2.0 mg CuSO₄.L⁻¹. Copper sulphate also caused biochemical changes in both experiments. It was observed that this chemical causes a decrease in the concentration of GSH. The histopathological analysis showed hyperplasia and secondary lamellae fusion in the gills, and necrosis of the hepatopâncreas in both experiments. The tests results with *C. dubia* and *P. subcapitata* showed that copper sulphate caused acute toxicity to these organisms. This study showed that copper sulphate has caused chronic toxicity in fish and acute toxicity to algae and microcrustaceans. These results indicate that the pollutant can act at different trophic levels.

Key-words: sub-lethal effect, fish, algae, cladocerans, biomarkers

1. INTRODUÇÃO

No Brasil diversos produtos químicos são utilizados para combater doenças em peixes, entretanto, são poucos os estudos realizados com o objetivo de se avaliar os efeitos tóxicos das drogas utilizadas no combate às doenças que afetam a icitofauna de um modo geral (PAVANELLI *et al.*, 2002). Entre os produtos utilizados na aquicultura pode-se destacar o sulfato de cobre, usado tanto no controle de doenças, quanto no controle do crescimento excessivo do fitoplâncton. Entretanto, o sulfato de cobre pode atingir organismos não alvos, como os peixes, comprometendo a saúde da biota em geral.

Os testes de toxicidade consistem em uma das ferramentas úteis para avaliar os danos causados pelos contaminantes ambientais. Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a avaliação dos efeitos dos produtos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ao ambiente. Para efeito de monitoramento de um corpo d'água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes de toxicidade mais utilizados são os de avaliação da toxicidade aguda e crônica (RAND e PETROCELLI, 1985).

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo. Por outro lado, os testes de toxicidade crônica podem ser considerados como a exposição dos organismos a agentes químicos, em níveis sub-letais, podendo não levar à morte destes, mas causando em longo prazo distúrbios fisiológicos e comportamentais (ARAGÃO e ARAÚJO, 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tóxico do CuSO_4 em condições experimentais para peixes através de análises hematológicas, imunológicas (da atividade fagocítica), bioquímicas (determinação da concentração de GSH, da atividade enzimática da GST e catalase e peroxidação lipídica), e histopatológicas. Além disso, verificar o efeito ecotóxicológicos deste composto para algas e microcrustáceos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cobre

O cobre apresenta quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico (Cu^{++}) e íon trivalente (Cu^{+++}). Pode ser encontrado na natureza tanto na forma elementar como na forma metálica. Por estar presente na crosta terrestre, a principal fonte natural do cobre são as poeiras. Outras fontes naturais, em ordem de importância são os vulcões, os processos biogênicos, os incêndios florestais e as névoas aquáticas (PEDROZO, 2003). As fontes antrópicas de cobre incluem a emissão pelas atividades de mineração e fundição, pela queima de carvão como fonte de energia, pelos incineradores municipais, descargas industriais, agente antiaderente em pinturas, na agricultura (fertilizante, algicida, fungicida e suplemento alimentar). O sulfato de cobre é mundialmente utilizado para inibir o crescimento de algas em reservatórios. Porém, somente 7% do total de cobre produzido são empregados no tratamento de água, 65% são utilizados na agricultura e 28% na indústria (WHO, 1998).

O aumento da concentração de cobre no ambiente pode ser atribuído tanto a fontes naturais quanto a antropogênicas, entretanto, as fontes antropogênicas tem sido as maiores responsáveis por elevar os níveis desse elemento em vários ecossistemas (PEDROZO, 2003).

A forma físico-química do cobre determina seu comportamento no meio ambiente e sua disponibilidade à biota. Por exemplo, o cobre incorporado à estrutura da rede mineral é inerte e de pouco significado ecológico. A maioria dos métodos analíticos não distingue a forma de cobre presente, sabe-se somente o total de metal contido na matriz. Na água, a literatura mostra que a biodisponibilidade é geralmente pequena para as concentrações de metais totais. A biodisponibilidade do cobre é influenciada no sistema aquático pela complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, adsorção a óxidos metálicos,

argila e material particulado em suspensão, bioacumulação e trocas entre a interface água e sedimento (WHO, 1998).

O cobre é um elemento essencial para toda biota, estudos mostram que este micronutriente é necessário para o crescimento de animais e plantas. Para satisfazer sua demanda metabólica interna todas às espécies de um habitat estão adaptadas às concentrações dos elementos essenciais naturalmente presentes. Desse modo, o cobre pode ser tóxico em elevadas concentrações, entretanto, em concentrações muito baixas pode ser limitante ou causar sinais de deficiência (ATSDR, 1990).

Como mencionado anteriormente o cobre é um micronutriente essencial, e está incorporado a um grande número de enzimas e proteínas estruturais. Assim, como outros metais, o cobre desempenha papel importante na regulação da expressão gênica. Vários estudos demonstram a existência de fatores de transcrição regulados pelo cobre. O mecanismo de regulação transcricional se deve à ligação do cobre a promotores de metalotioneína, mais precisamente a elementos que respondem a metais (MRE) (UAUY *et al.*, 1998).

A necessidade de cobre nos vários órgãos ou nos sistemas do organismo é regulada por mecanismos de controle homeostáticos. A toxicidade do cobre ocorre quando tais mecanismos de controle dentro de um determinado compartimento são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são destruídos (PEDROZO, 2003).

O excesso de cobre é sequestrado por moléculas de metalotioneínas ricas em cisteína, fitoquelatinas e sulfetos. O radical sulfidríla da cisteína nos peptídeos e proteínas funciona como ligante nos íons metálicos. As cisteínas das metalotioneínas correspondem a 20-30% dos aminoácidos e estão arranjadas em seqüência repetitivas. A glutatona também apresenta cisteína em sua seqüência (DAMERON e HARRISON, 1998).

O cobre quando em excesso, promove as seguintes reações adversas: deslocamento do metal de seus sítios de ligação resultando em alterações nas membranas como despolarização e dano dos receptores ou moléculas transportadoras; ligação do cobre a macromoléculas como DNA ou enzimas contendo grupamento sulfidrilas, carboxilas ou imidazólicos, resultando em dano protéico, alterações oxidativas do DNA, com conseqüentes alterações funcionais decorrentes do grande número de enzimas dependentes do cobre; dano celular devido à produção de oxiradicais pela reação de Fenton. A produção excessiva de tais radicais iniciará a cascata de oxiredução (estresse oxidativo) levando a perda da integridade celular. Este dano inclui aumento nos níveis de cálcio citosólico, depleção de ATP, oxidação do tiol, lipoperoxidação, dano no DNA e em organelas críticas como mitocôndrias e lisossomos (WHO, 1998).

O quadro apresenta um resumo das diferentes respostas da biota aquática diante de várias concentrações de cobre em locais onde a biodisponibilidade encontra-se entre moderada e elevada.

Quadro 1 - Respostas esperadas para várias faixas de concentrações de cobre na água.

Faixa de concentração de cobre dissolvido na água ($\mu\text{g/L}$)	Resposta observada
1-10	Efeitos significativos são esperados para diatomáceas e invertebrados sensíveis como cladóceros. Efeitos significativos em peixes de água doce quando pH e dureza da água são baixos.
1-100	Efeitos significativos são esperados para várias espécies de microalgas, algumas espécies de macroalgas; vários invertebrados incluindo crustáceos, gastrópodes e ouriço do mar. Vários peixes podem apresentar efeitos subletais
100-1000	A maioria dos grupos taxonômicos de macroalgas e invertebrados será afetada seriamente. Estas concentrações correspondem aos níveis letais para a maioria de espécie de peixes.
>1000	Concentrações letais para a maioria dos organismos aquáticos tolerantes.

FONTE, WHO 1998

2.2 Sulfato de cobre e aqüicultura

O manejo inadequado na aqüicultura muitas vezes promove a proliferação de doenças nos organismos cultivados. A consequência é a forte dependência por insumos químicos, a fim de sanar os problemas gerados. Os procedimentos de manejo podem levar à bioacumulação de contaminantes químicos e tóxicos nos organismos cultivados e a transferência desses para níveis mais altos da cadeia trófica, contaminando assim, o ecossistema em que a aqüicultura está inserida (ARANA, 1999).

Outro problema relacionado à aqüicultura 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, podendo favorecer e dar origem ao fenômeno chamado floração ou *bloom* de algas (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000), como consequência desse fenômeno muitas vezes ocorre mortalidade massiva dos peixes (SEVRIN-REYSSAC e PLETIKOSIC, 1990). Além disso, o excesso de algas principalmente cianofíceas é responsável pelo odor desagradável conhecido como off-flavour em peixes.

Entre os vários produtos utilizados na aqüicultura, destaca-se o sulfato de cobre, utilizado tanto como algicida, quanto como parasiticida. Solução de sulfato de cobre é comumente usada para prevenção e controle de *Ichthyophthirius multifiliis* (“ictio”) (LING e TAN, 1990). O sulfato de cobre também protege peixes contra infecções bacterianas como as causadas por *Flavobacterium columnare*. MACFARLANE *et al.* (1986) registraram que baixa concentração de cobre ($10 \cdot \mu\text{gL}^{-1}$) protegeu, *Morone saxatilis* contra infecção induzida por *F. columnare*. Esta proteção parece ser devida à absorção do cobre pelo epitélio ou mucosa superficial dos peixes.

De acordo com LING *et al.* (1993), concentração de $288 \mu\text{L}^{-1}$ de sulfato de cobre aumentou a taxa de sobrevivência do peixe *Carassius auratus* contra *I. multifiliis*. Peixes expostos ao sulfato de cobre por 120 minutos tiveram taxa de sobrevivência de 88,9% quando comparados com peixes

expostos por 30 e 60 minutos, que tiveram taxa de sobrevivência de 33,3 e 55,6%, respectivamente. Já, nos peixes que não foram tratados com sulfato de cobre apresentaram taxa de sobrevivência de 5,6%. PAVANELLI *et al.* (2002) recomendam o uso de sulfato de cobre no controle de saprolegniose, doença provocada por fungos do gênero *Saprolegnia*, com banhos de uma hora, em concentrações de 15 ou 25 mg.L⁻¹ do produto. Os mesmos autores recomendam a concentração de 0,75 mg.L⁻¹ de solução de sulfato de cobre por 14 dias para combater o protozoário *Amyloodinin ocelatum*.

As propriedades algicidas do sulfato de cobre são bem conhecidas (STEEMAN NIELSEN e WIUM ANDERSEN, 1970; LEWIS e CAVE, 1982; TUCKER e BOYD, 1985). O sulfato de cobre pode ser aplicado em lagos em concentrações que variam de 0,25 ng.L⁻¹ a 30 ng.L⁻¹, dependendo da dureza da água (GRATZEK, 1983). De acordo com a CETESB (1997; 2005) o controle da densidade das algas pode ser feito pelo sulfato de cobre em concentrações entre 0,2 a 1,0 mg.L⁻¹ de Cu SO₄.

O cobre é especialmente tóxico para algas porque reduz a fotossíntese (STEEMAN- NIELSEN e KAMP-NIESEM, 1970), inibe a divisão celular (ERICKSON, 1972) e impede a fixação do nitrogênio pelas cianofíceas (HORNE e GOLDMAN, 1974). Contudo, a aplicação desses produtos pode gerar efeitos adversos, uma vez que podem ser tóxicos para organismos não-alvo, além disso, a própria morte das algas, pode liberar toxinas em concentração suficiente para causar danos a outras espécies e comprometer o uso da água.

O sulfato de cobre pode ser muito tóxico dependendo da concentração em que é utilizado, além disso, fatores ambientais como oxigênio dissolvido, pH, temperatura, sólidos dissolvidos, dureza, alcalinidade, condutividade elétrica, presença ou ausência de outros metais podem atuar sinergisticamente e fatores fisiológicos, como o nível alimentar dos animais, podem levar à variação da sensibilidade influenciando a toxicidade dos agentes tóxicos (DAMATO, 2000)

De acordo com o CONAMA (2005) o nível máximo de cobre em águas destinadas à aquicultura deve ser de $0,009\text{mg.L}^{-1}$.

A exposição ao cobre pode causar efeitos fisiológicos, como demonstrado por DE BOECK *et al.* (1995), que observou a diminuição de dois neurotransmissores no cérebro de carpa, envolvidos no comportamento alimentar e controle locomotor dos peixes. Estudos ultraestruturais tem demonstrado que a exposição ao cobre induz a morte de neurônios receptores olfatórios (KLIMA e APPLEHANS, 1990; MORAN *et al.*, 1992).

O cobre também pode causar alguns danos histológicos em peixes. KARAN *et al.* (1998) registram hiperplasia epitelial nas brânquias de carpa expostas a $0,25\text{ mg.L}^{-1}$ de cobre e fusão das lamelas secundarias a $0,50\text{ mg.L}^{-1}$. A exposição ao cobre também pode resultar em danos histopatológicos no fígado, rim e órgãos hematopoiéticos (BAKER, 1969; SORENSEN, 1991).

O sistema imune também pode ser afetado pelo cobre. Alguns trabalhos na literatura registram supressão ou estimulação em células do sistema imunológico (O' NEILL, 1981; ANDERSON *et al.*, 1989; KHANGAROT e TRIPATHI, 1991), além de baixa resistência viral em peixes desafiados com bactérias após exposição ao cobre (BAKER e KNITTEL, 1983).

Outras alterações incluem inibição de vários passos do processo reprodutivo (BILLIARD *et al.*, 1981) deformidades vertebrais (BENGSTON e LARSSON, 1986) inibição da atividade de enzimas específicas (LORZ e McPHERSON, 1976) aumento do consumo de O_2 (O'HARA, 1971) e alterações hematológicas (NUSSEY *et al.*, 1995).

2.3 Organismos-teste

2.3.1 *Oreochromis niloticus*

Uma das ferramentas úteis para se avaliar os danos causados pelos contaminantes ambientais é o teste de toxicidade. Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam avaliar os efeitos dos produtos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ao ambiente. Para efeito de monitoramento de um corpo d'água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes de toxicidade mais utilizados são os de avaliação da toxicidade aguda e crônica. (RAND e PETROCELLI, 1985).

Dentre os diversos organismos utilizados para testes de toxicidade estão os peixes. Bioensaios com peixes permitem estudar, sob condições controladas, alguns parâmetros 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).

Os peixes atuam como importante recurso ao exercer a função de bioindicadores de áreas possivelmente contaminadas e, entre os contaminantes, pode estar o cobre de origem natural e artificial (PORVARI, 1995; HYLANDER *et al.*, 2000). Estes organismos são considerados organismos padrão para testes de toxicidade aguda, assim como para testes de toxicidade crônica. A importância de peixes de água doce em ecotoxicologia é tanto ecológica quanto econômica. O fato dos peixes, ocuparem níveis tróficos elevados entre os organismos aquáticos, faz com que estes animais, através da cadeia alimentar, acumulem altos teores de substâncias por biomagnificação. Além disso, os peixes podem ser considerados a principal rota de contaminação humana (REYNOLDSON e DAY, 1993).

A espécie *O. niloticus* uma das mais importantes de água doce para a aquicultura (BARRIGASSOSA *et al.*, 2004), e também uma espécie muito importante para a pesca mundial (BALIRWA, 1992). Entre as inúmeras regiões habitadas por essa espécie, muitas estão sob ameaça de poluentes, incluindo o

cobre (KHALLAF *et al.*, 1998, 2003; ADHAM *et al.*, 1999). Esta espécie já foi utilizada em estudos como bioindicadoras na avaliação do impacto de poluição, justamente por apresentar uma ampla distribuição geográfica e características ecológicas e fisiológicas conhecidas e favoráveis neste tipo de estudo (ARIAS *et al.*, 2007).

2.3.2 *Pseudokirchneriella subcapitata*

As algas estão entre os organismos mais recomendados para ensaios de avaliação da toxicidade aquática. Além de serem produtores primários na cadeia alimentar do 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. Outras características como facilidade em mantê-las em culturas e capacidade de crescimento em meios sintéticos definidos tornam as algas úteis como organismos teste (RODRIGUES *et al.*, 2003)

Segundo VIDOTTI e ROLLEMBERG (2004), os ensaios com algas abrem a possibilidade de uma combinação de medidas físicas, químicas e biológicas, que resulta em informações importantes, as quais permitem identificar materiais que afetam o crescimento, bem como avaliar a disponibilidade biológica de nutrientes e determinar curvas dose-resposta para substâncias limitantes ou estimulantes do crescimento.

Estudos com fitoplâncton indicam que as algas apresentam uma rápida resposta fisiológica, e, assim, efeitos deletérios provocados por compostos tóxicos podem ser detectados num curto período de tempo (SICKO-GOAD e STOERMER, 1988). Para HELLAWELL (1986) as algas podem ser utilizadas como monitores biológicos de qualidade de água e como espécies indicadoras na avaliação de impacto ambiental de poluentes.

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente denominada como *Selenastrum capricornutum* e *Rhaphidocelis subcapitata*) é considerada um organismo modelo padrão para testes de toxicidade e é amplamente usada em testes de inibição de crescimento algal pela US Environmental Protection Agency (USEPA, 1996). Esta espécie também tem demonstrado ser bastante sensível a metais pesados (BLINOVA, 2004; KAHRU *et al.*, 2005), e amostras ambientais assim como descargas industriais (KALLQVIST *et al.*, 2008). Devido à sua alta sensibilidade, e compatibilidade com diferentes técnicas de amostragem ambiental, bioensaios com algas são frequentemente incluídos em baterias de teste para medir toxicidade de rios e sedimentos (AHLF e HEISE, 2005; BLINOVA, 2000; DE VLAMING *et al.*, 2000; LATIF e LICEK, 2004; WEI *et al.*, 2006).

2.3.3 *Ceriodaphnia dubia*

A comunidade zooplancônica possui expressiva importância em ambientes aquáticos, pois os diversos tipos de organismos que a compõe fazem parte da cadeia trófica destes ambientes, sendo a principal ligação entre os produtores primários e os consumidores de níveis mais altos na cadeia trófica aquática como peixes, aves e até mesmo a espécie humana.

Outra importância do zooplâncton reside no fato de que diversas espécies apresentam maior sensibilidade às variações das condições ambientais (como temperatura, salinidade, pH, nutrientes, entre outras) e a presença de diversas substâncias químicas. Desta forma, muitas espécies zooplancônicas são indicadoras das alterações ambientais e, conseqüentemente da saúde do ecossistema

Além da importância ecológica, as vantagens do uso de cladóceros incluem seu curto ciclo de vida, a facilidade de cultivo em laboratório, por necessitarem de pouco espaço e pouco volume de água (PARKHURST *et al.*, 1981; PRESING, 1981; ADEMA *et al.*, 1982; BAUDO, 1987; MUNZINGER e MONICELLI, 1991).

Os cladóceros do gênero *Ceriodaphnia* são mais representativos de águas continentais no território brasileiro quando comparados à *Daphnia* sp, sendo possível a coexistência de diversas espécies (ROCHA *et al.*, 1995). Ensaios com *C. dubia* geralmente permitem duas leituras de resultado (toxicidade aguda e crônica), sendo, portanto, empregados internacionalmente pelas agências ambientais, especialmente da Comunidade Européia, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, para o controle das inúmeras descargas de efluentes líquidos industriais e municipais em ambiente aquático (NASCIMENTO *et al.*, 2002).

2.4 Bioacumulação

Uma vez lançado no ambiente aquático, um composto químico tem distribuição complexa, determinada pela dinâmica dos processos de partição entra suas fases, a saber:

1. A fase aquosa e a biota (microalgas, plantas superiores, invertebrados e peixes);
2. A fase aquosa e o sedimento
3. O sedimento e a biota residente

Assim, dependendo das propriedades físico-químicas do composto, de sua concentração e também das características físico-químicas dos ecossistemas, podem ocorrer efeitos adversos à biota. Dessa forma, algumas substâncias químicas, quando introduzidas no ambiente aquático apresentam características particulares como a persistência, ou seja, exibem alta resistência à degradação biótica e/ou abiótica. Nestes casos, concentrações desses compostos, que de acordo com os critérios estabelecidos através de testes de toxicidade aguda ou mesmo crônica parecem ser seguras, podem se acumular, atingindo níveis elevados nos organismos e determinando efeitos deletérios. Os efeitos desse processo, conhecido como bioacumulação, podem não ser notados até que quantidades significativas do contaminante tenham sido lançadas no ambiente (BURATINI e BRANDELLI, 2008).

Alguns fatores relativos ao próprio contaminante são determinantes no processo de bioacumulação, tais como, a solubilidade, estabilidade, estereoquímica (configuração espacial e tamanho da molécula), hidrofobicidade (associação a superfícies ou solventes orgânicos), fugacidade (tendência termodinâmica de um composto químico em migrar de determinado compartimento). Existem ainda fatores relativos à biota que interferem na bioacumulação. A biotransformação, por exemplo, processo no qual o xenobiótico pode ser transformado via reações enzimáticas e removido do organismo, outros fatores como teor de lipídios, depuração e taxa metabólica também interferem nesse processo (BURATINI e BRANDELLI, 2008).

A bioacumulação pode ser definida então, como a rede de absorção do poluente pelos microorganismos, plantas ou animais a partir do seu entorno (água, sedimento, solo e dieta). É afetada pela biodisponibilidade da substância, que por sua vez é influenciada pela espécie do metal, e bem como propriedades físico-químicas do meio que regulam o seqüestro de substâncias. Quanto maior a biodisponibilidade maior o potencial tóxico ou bioacumulação da substância (ATSDR, 1990).

Como os metais pesados tendem a bioacumular nos organismos aquáticos, eles podem ser transferidos através da cadeia alimentar, ocasionando sua bioconcentração (RAND e PETROCELLI, 1985). O acúmulo desses compostos na musculatura dos organismos aquáticos pode comprometer a sua utilização para o consumo humano.

2.5 Biomarcadores de contaminação aquática

Os Biomarcadores são hoje definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1993; DEPLEDGE *et al.*, 1993 apud Nascimento *et al.*, 2008)).

A resposta biológica às agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares, passando por comunidades, populações, organismos, sistemas fisiológicos e células (WALKER *et al.*, 1997).

As conseqüências de alterações bioquímicas são difíceis de interpretar em níveis de organização mais altos (Figura 1) (NEFF, 1984). Entretanto, toda resposta biológica se manifesta primeiramente em nível bioquímico-celular (molecular). Se parâmetros bioquímicos puderem ser significativamente correlacionados com efeitos verificáveis em níveis superiores de organização biológica, poderão detectar perturbação ambiental preliminar à ocorrência de respostas irreversíveis (DEPLEDGE, 1992 apud Nascimento, 2008), conseqüentemente, as técnicas que evidenciam respostas em níveis mais baixos de organização biológica são mais preventivas.

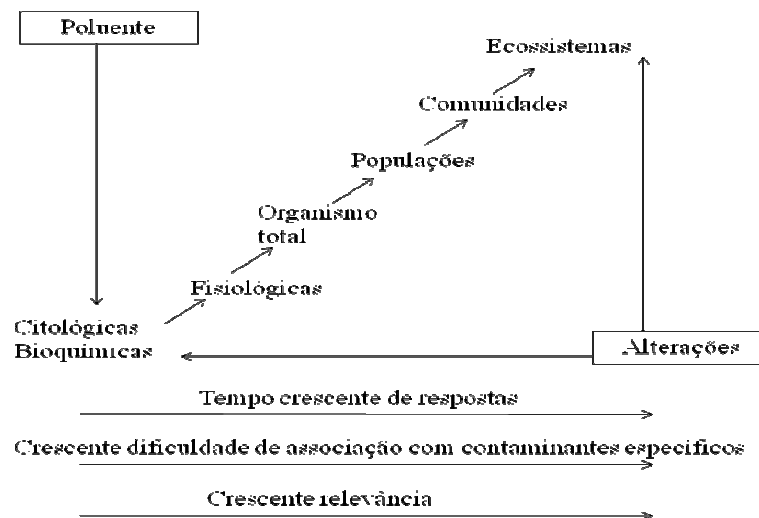


Figura 1 – Hierarquia biológica e respostas a poluentes. Fonte NASCIMENTO *et al.* (2008)

O uso de biomarcadores nas avaliações de risco apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de exposições potencialmente tóxicas bem antes que efeitos adversos reais possam ocorrer. Portanto,

estudos de biomarcadores hematológicos, histopatológicos, imunológicos, estresse oxidativo consistem em uma ferramenta útil para avaliar o efeito desses contaminantes nos ambientes aquáticos.

2.5.1 Hematologia

A qualidade da água pode ser considerada um dos maiores responsáveis por variações individuais na hematologia de peixes, isto porque esses animais vivem em contato íntimo com seu ambiente externo e são sensíveis a qualquer mudança que possa ocorrer (CASSILAS e SMITH, 1977). A contaminação da água por agentes tóxicos como metais pesados é um dos fatores responsáveis por variações hematológicas (VAN VUREN, 1986, 1994; ISHIKAWA *et al.*, 2007), podendo afetar um ou mais parâmetros do sangue. Portanto, peixes podem ser usados como um sistema de alerta indicando a presença de poluentes em águas naturais (NUSSEY *et al.*, 1995)

DICK e DIXON (1985) sugerem que a quantidade dos diferentes tipos de células sanguíneas circulantes constitui um parâmetro importante para a detecção e a avaliação dos efeitos subletais de substâncias tóxicas em peixes. A hematologia pode ser considerada como um parâmetro essencial para se avaliar o estado geral de saúde de diversas espécies de peixes (NUSSEY *et al.*, 1995).

2.5.2 Imunologia

Entre os sistemas bioquímico, celular e fisiológico de animais multicelulares que podem ser monitorados em ecotoxicologia, o sistema imune inato tem algumas características que o tornam atrativo nesses estudos. Mais comumente do que outros processos biológicos o sistema imune inato é diretamente afetado pela interação de uma espécie com outros organismos, uma característica essencial em ecologia. Mudanças detrimenais no sistema imune são importantes em ecotoxicologia porque podem influenciar populações por afetarem a susceptibilidade de indivíduos a doenças (BOLS *et al.*,

2001). Além disso, muitos componentes da imunidade inata parecem ser evolutivamente conservados (HOFFMAN *et al.*, 1999; ULEVITCH, 2000), o que poderia significar que a sensibilidade de um mecanismo imune para um determinado contaminante é similar entre diferentes espécies, o que poderia prever o impacto de um contaminante ambiental mais facilmente (BOLS *et al.*, 2001).

O sistema imune frequentemente é afetado por poluentes aquáticos. Metais pesados são conhecidos por induzir mudanças imunológicas em peixes. Em mamíferos, testes imunotoxicológicos desafiando animais expostos a metais pesados com patógenos intracelulares fornecem um razoável ponto de partida para avaliar o potencial imunotóxico desses componentes (KOWOLENKO *et al.*, 1992).

Os peixes são um grupo animal importante na perspectiva da imunidade e ecotoxicologia. O conhecimento, por exemplo, das mudanças da imunidade inata em peixes, podem fornecer informações sobre mudanças na saúde do ambiente aquático (BOLS *et al.*, 2001). Portanto, o monitoramento da saúde do animal dá uma visão das condições do ambiente aquático (ZELIKOFF *et al.*, 2000). Outro fator importante é que alterações no sistema imune de peixes podem servir como um alerta de potencial impacto na saúde do homem e do ecossistema, uma vez que muitos poluentes são lançados primeiramente no ambiente aquático e então, por uma variedade de rotas alcançam o homem e outros animais terrestres (ZELIKOFF, 1998; ADAMS e GREELEY 1999).

O estudo da fagocitose é frequentemente realizado em análises ecotoxicológicas. Este processo envolve vários passos: quimiotaxia, ataque, ingestão, degradação, morte intracelular e digestão intracelular. Dentre estes um dos mais estudados em ecotoxicologia é a ingestão. Para este estudo diversas partículas e métodos de monitoramento de sua ingestão são usados para avaliar o efeito de contaminantes nos fagócitos (BOLS *et al.*, 2001). Dentre essas partículas pode-se citar as leveduras e bactérias.

Uma das maneiras de avaliar o sistema imunológico pode ser através da estimulação da atividade fagocítica pela injeção de leveduras em animais previamente expostos a metais pesados, por exemplo, avaliando dessa forma, a ação desses sobre a atividade fagocítica (SILVA *et al.*, 2002, 2005).

2.5.3 Análises Bioquímicas

Organismos aquáticos podem ser expostos a diversos poluentes, como metais pesados ou pesticidas e seus órgãos podem acumular metais como o cobre, os quais podem levar a reações do tipo redox, gerando radicais livres e, portanto, podem causar alterações em certos processos fisiológicos (VARANKA *et al.*, 2001).

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). É este não-emparelhamento de elétrons na última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Os radicais livres são formados em um cenário de reações de oxidação-redução. Na verdade, o termo radical livre não é ideal para os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como na sua maioria, os radicais são derivados do metabolismo do O₂, o termo mais apropriado é espécie reativas do metabolismo do oxigênio (ERMOS) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxidos, (O₂⁻), hidroperóxido (HO₂[·]), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂). Normalmente a redução do O₂ ocorre na mitocôndria (COHEN, 1989 apud FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores como as espécies reativas de oxigênio (ERMOS) e o sistema antioxidante. Esses agentes são liberados endogenamente como consequência do metabolismo do O₂, e também em situações não fisiológicas como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta do O₂ (SHAN *et al.*, 1990 apud FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa antioxidante que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora de agentes antes que cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-PX) e vitamina E. A outra linha de defesa tem função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione reductase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros (SHAN *et al.*, 1990; HEBBEL, 1986 apud FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção das EROS nos organismos, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, pode ser causado, por exemplo, pela exposição a metais pesados. Essa situação gera um estado pró-oxidante, que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar, inclusive na morte celular (GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Essa lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo e designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidante (SIES, 1999)

Entre as lesões oxidativas podemos destacar a peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO-FILHO *et al.*, 1983). Conseqüentemente há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte

celular (HERSHKO 1989). As membranas celulares e intracelulares, que possuem grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, são um importante alvo para o ataque de radicais livres (ROVER-JUNIOR *et al.*, 2001).

O monitoramento de mudanças bioquímicas em peixes é um caminho altamente sensível e correto para medir o efeito de compostos xenobióticos em laboratórios e estudos de campo (HINTON e LAUREN, 1990). Metais pesados, como o cobre, podem aumentar ou diminuir a atividade de enzimas como catalase, SOD, GSH-Px, e GSH-Rd (RADI e MATKOVICS, 1988; RODRIGUEZ-ARRIZA *et al.*, 1993) o que pode causar um estado pró-oxidante e conseqüentemente estresse oxidativo.

2.5.4 Histopatologia

De acordo com LEASE (2003), estudos histopatológicos podem ser usados como uma ferramenta de alerta primário para monitorar a saúde dos peixes no ambiente. Entre os vários indicadores de toxicidade, as análises histológicas de diferentes órgãos podem indicar resposta biológica diante de uma situação desfavorável, já que freqüentemente a exposição prolongada dos organismos a agentes tóxicos pode não provocar diretamente sua morte, mas afetar a estrutura e a função de órgãos vitais, colocando em risco o indivíduo, a população e algumas vezes a espécie (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; AU *et al.*, 1999). Segundo WESTER e ROGHAI (1994), o estudo histopatológico pode revelar efeitos tóxicos estruturais específicos em vários órgãos de peixes utilizados experimentalmente em laboratório.

Respostas histológicas são relativamente de fácil determinação, e podem estar relacionadas com a saúde de um indivíduo, que por sua vez permite a extrapolação para efeitos na população ou comunidade. Uma ampla variedade de alterações histológicas em peixes e bivalves tem sido desenvolvida e recomendada como biomarcadores de contaminação ambiental. Estudos nos Estados

Unidos e Europa tem estabelecido uma relação causal entre patologias de peixes e níveis de poluentes em ambientes marinhos. Nesses programas lesões histopatológicas em peixes funcionam como um indicador primário de exposição a contaminantes, e certos tipos de lesões são indicadores biológicos seguros para efeitos tóxicos e carcinogênicos resultantes de exposição (AU, 2004).

Entre os órgãos usados para estudos histopatológicos, podemos destacar o fígado, principalmente por ser o órgão primário para biotransformação de xenobióticos orgânicos, e provavelmente é o responsável pela detoxificação de metais traços prejudiciais (HEATH, 1995). O fígado de peixes é sensível a contaminantes ambientais porque muitos desses contaminantes tendem a acumular-se no fígado, o que faz com que esse órgão tenha níveis mais altos de poluentes do que o ambiente ou outros órgãos (HEATH, 1995).

As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais responsáveis pela respiração, osmorregulação, balanço acido-base e excreção de resíduos nitrogenados. Esse órgão é sensível à químicos na água, uma vez, que filamentos e lamelas branquiais, fornecem uma grande superfície para contato direto e contínuo com contaminantes na água. Assim como o fígado, as mudanças histopatológicas nas brânquias são, em geral, uma resposta não específica à exposição dos poluentes (AU, 2004).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Conhecer o potencial tóxico do CuSO_4 sobre alguns mecanismos biológicos, através de exposição em condições experimentais

Objetivos específicos

Avaliar os efeitos sub-letais do sulfato de cobre para a tilápia durante exposição e recuperação

Determinar os resíduos de cobre nos peixes

Avaliar o efeito do cobre sobre as variáveis hematológicas da tilápia

Avaliar os efeitos sub-letais na atividade fagocítica dos macrófagos

Avaliar os efeitos sub-letais do cobre sobre parâmetros bioquímicos (GST, GSH, Catalase e peroxidação de lipídeos)

Caracterizar o efeito do cobre nas brânquias e no fígado dos peixes

Realizar teste de toxicidade aguda para a alga *P. subcapitata* e para o microcrustáceo *C. dubia*,

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensaio I- Exposição

Com o objetivo de determinar o efeito sub-letal do sulfato de cobre sobre a tilápia, *Oreochromis niloticus*, foi realizado um ensaio com duração de 30 dias. Para isso, foram utilizados jovens de tilápia com peso médio $38,29 \pm 6,01\text{g}$ e comprimento total médio de $14,00 \pm 0,65\text{cm}$ provenientes de uma piscicultura comercial, cada tratamento continha 70 peixes. O experimento foi realizado no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca – SP.

Os peixes utilizados nos testes foram aclimatados por um período de sete dias, em tanque com água decolorada com capacidade 1000 L. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial com 32% de proteína.

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para caixas d'água de 350 L, com os seguintes tratamentos: Controle, $0,5\text{mg.L}^{-1}$ e $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Figura 2). O experimento foi conduzido durante 30 dias, na densidade de $7,6 \text{ g.L}^{-1}$ por caixa, com amostragem de 10 indivíduos por tratamento para as análises hematológicas, histopatológicas, bioquímicas e determinação de cobre e outros 6 indivíduos para as análises imunológicas aos sete, 15 e 30 dias. Durante o experimento, os peixes eram alimentados diariamente com ração comercial. O experimento foi semi-estático, com

substituição de 1/3 da água a cada três dias por uma solução previamente preparada e de mesma concentração. Durante as trocas foi realizada sifonagem do excedente e de excretas. A mortalidade foi registrada diariamente.

A água utilizada nos experimentos foi proveniente do abastecimento urbano. O cloro residual desta fonte foi eliminado por meio do processo de filtração (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 os experimentos: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica. A análise da dureza pelo método titulométrico do EDTA, alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) por titulometria e amônia total ($\text{mg NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$) pelo método colorimétrico do reagente de Nessler, foram realizadas semanalmente.

A substância química utilizada foi sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), do laboratório Merck®. Preparou-se uma solução estoque da substância química utilizada, diluindo-se 2g do sal em 1000 mL de água MILLI-Q, resultando em uma solução concentrada de $2000 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A partir dessa solução estoque foram obtidas as concentrações testadas (concentrações nominais de 0,5 e 2,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Logo após a adição da substância química, a água foi agitada para promover a homogeneização das soluções.

4.2 Ensaio I- Recuperação

Para o estudo da recuperação dos animais após exposição ao sulfato de cobre foi realizado um ensaio com as mesmas condições descritas para o primeiro ensaio. Entretanto, para este segundo ensaio, durante a exposição, não ocorreu amostragem de nenhum animal. Ao final de 30 dias 10 animais de cada tratamento foram amostrados para a determinação de cobre e realização das análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas e seis animais foram amostrados para a análise imunológica. Em seguida,

os animais das concentrações 0,5 e 2,0 mg.L⁻¹ foram retirados da condição de exposição, ou seja, livres de CuSO₄ e permaneceram somente em água na mesma condição que o tratamento controle. A partir desse momento as mesmas análises foram repetidas aos 7, 15 e 30 dias de recuperação.



Figura 2 – Caixas experimentais com os tratamentos do ensaio realizado com *O. niloticus*

4.3 Determinações de cobre

4.2.1 Água

Para a determinação de cobre nas amostras de água foi utilizado o Espectrofotômetro de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

Durante a troca de água dos ensaios, realizada a cada três dias, 500 mL de água foram coletados e posteriormente filtradas a vácuo em sistema Millipore usando Filtros de Microfibras de Vidro Whatman® GF/C, de 47 mm de Ø. As amostras filtradas foram acidificadas usando ácido nítrico p.a.(Merck®) para se obter uma solução a 2%. No momento da análise as amostras foram introduzidas no ICP via nebulização pneumática. O elemento foi quantificado mediante comparação contra padrão multielementar p/ ICP rastreado ao NIST-USA.

O equipamento a ser usado foi Espectrofotômetro de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

4.2.2 Peixes

A determinação de cobre consistiu em uma solubilização das amostras com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), uma base forte, solúvel em água que complexa e estabiliza elementos (CHO *et al.*, 1990), como o cobre. As amostras foram misturadas com TMAH e aquecidas a baixas temperaturas (SCHWINGEL *et al.*, 2000).

Músculo, brânquias e fígado de 10 animais foram coletados e mantidos congelados a -4°C até o momento da análise. No momento da análise aproximadamente 250 mg de cada órgão foi pesado e disposto em tubos falcon, acrescidos de 2 mL de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) + 2mL de água ultra-pura. Essa mistura foi aquecida a 70°C por uma hora, em seguida o volume foi completado à 10 mL. As determinações de cobre foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com limite de detecção $0,01\mu\text{g g}^{-1}$.

Para a validação dos resultados o mesmo procedimento foi realizado com o material certificado DORM-2 (músculo do peixe dogfish), pela National Research Council Canada. Os resultados obtidos neste estudo foram validados, uma vez que na solubilização do material certificado houve recuperação

de 100% da concentração de cobre presente no material. Os dados são apresentados em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso fresco.

4.4 Análises hematológicas

Para essas análises foram amostrados 10 animais nos tempos de sete, 15 e 30 dias após a contaminação com cobre. Os peixes foram retirados das caixas, anestesiados com benzocaina (100mg.L^{-1}) e o sangue coletado por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis, previamente heparinizadas (Figura 3A).

Com as amostras de sangue foram determinados: o número de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer utilizando-se o diluente de Hayem (Figura 3B), o hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito (Figura 3C), a taxa de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina (Figura 3D), e calculados os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média). Foram realizadas também contagem total e diferencial dos leucócitos e contagem total de trombócitos em extensões sangüíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo ROSENFELD (1947) (Figura 3E e 3F).

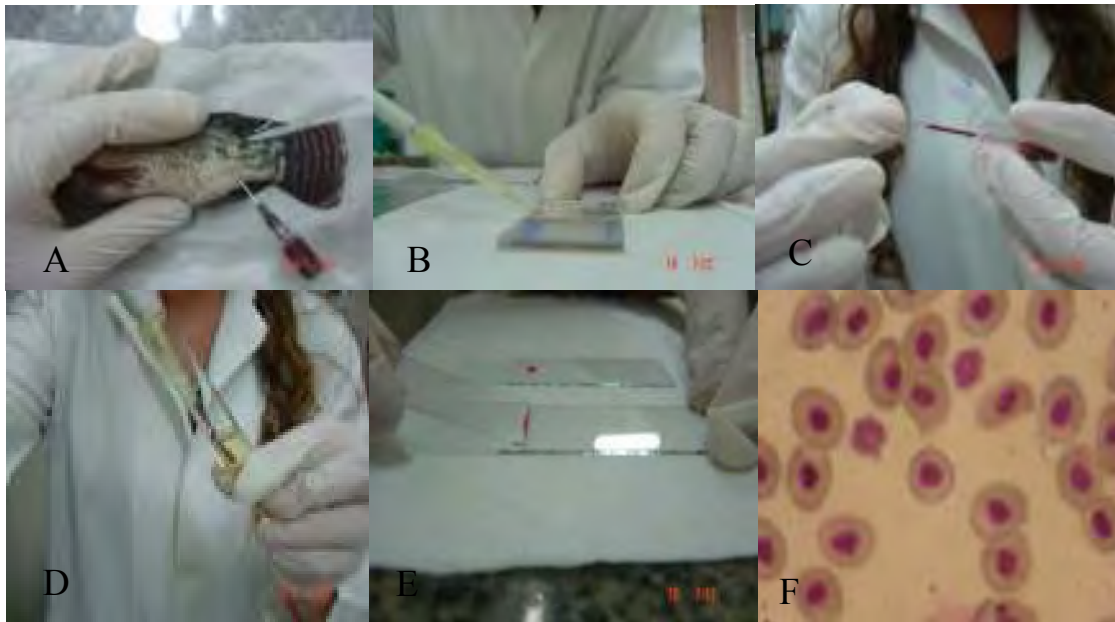


Figura 3 - Análises Hematológicas. Coleta de sangue por punção caudal (A). Contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer (B). Determinação de hematócrito (C). Taxa de hemoglobina (D). Confecção de extensões sanguíneas para a contagem total de leucócitos e total de trombócitos (E). Lâmina corada com Rosenfeld (F)

4.5 Análises imunológicas

Para avaliar o efeito do sulfato de cobre sobre o sistema imune de jovens de tilápia, *O. niloticus*, seis animais de cada grupo experimental foram coletados nos tempos sete, 15 e 30 dias após exposição. Os animais foram anestesiados e, em seguida, injetados intraperitonealmente com concentração de 8×10^3 célula/mm³ de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 4A) e mantidos em tanques com aeração contínua, por 4h (Figura 4B). Após o período de incubação, os peixes foram retirados das caixas, e anestesiados novamente 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 tampão PBS (0,7%) (Figura 4C). O líquido contendo as células inflamatórias foi aspirado com pipeta Pasteur (Figura 4D). O lavado foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Parte deste lavado foi utilizada para a determinação da capacidade fagocítica (C.F.) e do índice fagocítico

(I.F.) de macrófagos nos três diferentes tempos, através de microscopia de contraste de fase, segundo metodologia de SILVA *et al.* (2002, 2005), onde:

CF= Capacidade Fagocítica – Porcentagem de um determinado tipo celular que está fagocitando (Figura 4E)

$$CF = \text{n}^\circ \text{ de macrófagos fagocitando} / 100 \text{ macrófagos}$$

IF= Índice Fagocítico – é o número médio de leveduras no interior das células fagocíticas onde são contadas 100 células (Figura 5E)

$$IF = \text{n}^\circ \text{ total de leveduras no interior dos fagócitos} / \text{n}^\circ \text{ total de fagócitos ativos}$$



Figura 5 - Análises Imunológicas. injeção com concentração de 8×10^3 célula/mm³ de levedura *S. cerevisiae* (A). Animais mantidos por 4 horas para acumulação de macrófagos na cavidade celomática (B). Abertura da cavidade celomática (C). Cavidade celomática sendo lavada com tampão PBS (D). Macrófago ativo fagocitando duas leveduras (E).

4.6 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas 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, 10 animais foram mortos por sedação profunda e uma porção do fígado coletada, acondicionado em criotubos e mantido a -80°C até o momento da análise.

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

4.5.1 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 (BRADFORD, 1976). Para isso, 10 μL da amostra (fígado homogeneizados em tampão PBS) foram pipetados diretamente em cada poço de uma microplaca (4 réplicas) e em seguida foi adicionado 250 μL do reativo de Bradford, então, procedeu-se à leitura das absorbâncias ($\lambda = 620\text{nm}$). Utilizou-se o PBS como branco. As concentrações de proteínas foram obtidas comparativamente aos valores da absorbância da curva padrão BSA (albumina de soro bovino) nas concentrações 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BSA.

4.5.2 Atividade enzimática da GST

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

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

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e 15 μ L foram pipetados em uma microplaca (4 réplicas) e imediatamente antes da leitura adicionou-se 135 μ L do meio de reação (CDNB a 2mM + GSH a 4 mM, etanol a 4%, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5) (HABIG *et al.*, 1974; KEEN *et al.*, 1976). O aumento da absorbância foi registrado em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos. Foi selecionado o primeiro intervalo de 1 minuto com $r^2 \geq 0,99$ para cálculo do Δ absorbância por minuto.

4.5.3 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

As amostras foram descongeladas e para cada 250 μ L de amostra foram pipetados 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%) e então centrifugado a 2000 xg por 5 minutos, para precipitação protéica. Em seguida foram pipetados em microplaca 30 μ L do sobrenadante da amostra + 200 μ L de tampão tris pH 8,9 e por último 50 μ L de DTNB, imediatamente procedeu-se a leitura das absorbâncias ($\lambda = 415\text{nm}$). Como branco utilizou-se 2 μ L de PBS + reagentes (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A determinação da GSH foi obtida comparativamente com a curva padrão GSH (0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

4.5.4 Atividade Enzimática da catalase (CAT)

As amostras foram descongeladas em gelo e 10 μ L da amostra foi pipetada em uma cubeta de quartzo, em seguida foi adicionado 990 μ L do meio de reação (água deionizada e destilada + Tampão tris 1M, EDTA 5mM+H₂O₂ a 30%). O decréscimo gradual na absorbância, devido à degradação do peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984), foi monitorado e registrado num intervalo 1 segundo, por 45

segundos, imediatamente após serem misturados por imersão, realizou-se a leitura da absorbância em $\lambda=240\text{nm}$. 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 H_2O_2).

4.5.5 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 entre 550-570nm (JIANG *et al.*, 1991, 1992).

Para a realização desta análise as amostras que foram previamente homogeneizadas em PBS foram centrifugadas a 1000x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 200 μL do sobrenadante da amostra mais 1250 μL do meio de reação (laranja de xilenol, H_2SO_4 , BHT e $\text{FeSO}_4 \text{NH}_4$) 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 ($\lambda = 570\text{nm}$).

4.7 Análises histopatológicas

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

Para estas análises, foram retirados fígado e brânquias de seis animais, os órgãos foram transferidos para frascos com formol 10% tamponado por 24 horas, após esse período foram transferidos

para álcool 70%. As amostras foram incluídas em Paraplast Plus (MERCK[®]). Os blocos foram cortados com micrótomo LEICA[®], com obtenção de cortes com 5 micrômetros. Os cortes foram corados com HE (Hematoxilina-Eosina). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio ótico comum.

4.8 Ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos com *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Ceriodaphnia dubia* foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia aquática do Instituto de Pesca, SP

4.8.1 *Pseudokirchneriella subcapitata*

A realização dos ensaios ecotoxicológicos com algas seguiu as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 12648 (ABNT, 2005a). A espécie escolhida foi *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak, anteriormente denominada, por *Selenastrum capricornutum* e o meio de cultivo utilizado foi o meio líquido L. C. Oligo (ABNT, 2005a).

Três dias antes do início de cada bateria, um cultivo em massa foi montado com 1 litro de meio L. C. Oligo e 50 mL de suspensão algácea. Esse cultivo em massa foi mantido em erlenmeyer com volume de 2 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 sulfato de cobre 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 5): 1 – fase de indução ou *lag* (maioria das células é viável, 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)

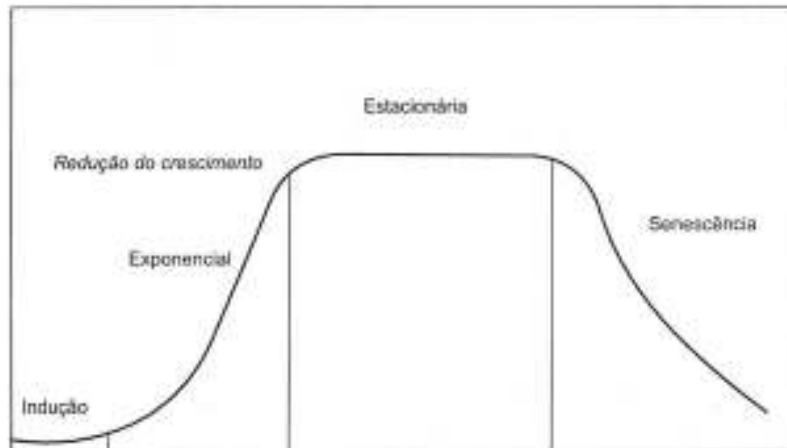


Figura 5 - Diferentes fases da curva de crescimento algáceo em sistema de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA 2001).

No dia da realização dos testes, 100 mL do cultivo em massa foi centrifugado por 15 minutos a 1500 g, 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, através de contagem em câmara de Neubauer, a fim de determinar o volume do inóculo a ser utilizado nos testes. Esse processo de centrifugação e ressuspensão foi feito 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:

$$V_i = (V_f \times C_i) / N$$

Onde:

V_i = volume do inóculo (mL)

V_f = volume da solução-teste (mL)

C_i = concentração inicial do recipiente-teste (células.mL⁻¹)

$N = \text{número de células da suspensão (células.mL}^{-1}\text{)}$

As soluções-teste foram estabelecidas de acordo com as recomendações da NBR 12648 (ABNT, 2005) para a diluição crescente de amostra. Para tanto, tomou-se como base a concentração de 2,0 mg/L de sulfato de cobre. 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.

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 (Figura 6). Após as 72 horas de exposição, a quantidade de algas em células/mL, de cada replicata, foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

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 6 - Vista interna da incubadora utilizada no experimento com a alga *P. subcapitata*

4.8.2 *Ceriodaphnia dubia*

O organismo-teste utilizado neste teste foi a *Ceriodaphnia dubia* (Crustácea: Cladocera), cuja espécie é comumente recomendada para ensaios desta natureza (LOMBARDI, 2004). A água utilizada foi de fonte natural, coletada no Ribeirão do Pirai, no município de Salto de Itu (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 normas da ABNT (2005b), 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 – IPEN. As variáveis limnológicas foram: dureza (mg.L^{-1}), pH, alcalinidade ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$), OD (mg.L^{-1}

¹), temperatura (°C), condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), turbidez (NTU), fósforo total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), nitrogênio amoniacal total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), nitrogênio total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), nitrito ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e nitrato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), seguindo a metodologia APHA *et al.* (2005).

As condições dos ensaios de toxicidade aguda e crônica seguiram a metodologia da NBR 13373 (ABNT, 2005b) e CETESB (1991), considerando-se um sistema semi-estático de sete dias de duração. 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 6 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 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sólidos-totais e 0,04 mL/organismo de suspensão de microalgas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* (cloroficea), na proporção aproximada de $2,0 \times 10^5$ células/mL, de acordo com a ABNT (2005b).

Os recipientes-testes (frascos contendo 15 mL de amostra) foram acondicionados em incubadora com temperatura média de $25,0 \pm 0,7$ °C, fotoperíodo de 16 horas claro: 8 horas escuro e luminosidade de 1.000 lux (Figura 7). As concentrações utilizadas nesse ensaio foram: cinco concentrações obtidas a partir da concentração 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ através das seguintes diluições: 6,2%, 12,5%, 25,0% e 50,0% e 100%. Todas essas concentrações foram preparadas em balões volumétricos e diluídas com a água de cultivo.



Figura 7 - Vista interna da incubadora utilizada no experimento com *C. dubia*

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-controlé elaborada com a substância de referência - Cloreto de Sódio (NaCl).

4.9 Análises estatísticas

A análise estatística utilizada no teste ecotoxicológico com alga para a determinação da concentração inibitória média (CI50), foi realizada através do método de interpolação linear para toxicidade subletal (ICPin) (NORBERG-KING,1993).

Para a análise dos dados do teste de toxicidade crônica foi utilizado o programa estatístico TOXSTAT 3.3 (GULLEY *et al.*, 1991). 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” do tipo unifatorial, e ao teste Tukey para comparar a diferença entre as médias dos tratamentos. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variáveis físicas e químicas da água dos ensaios I e II

Neste trabalho não ocorreram alterações nas variáveis físicas e químicas da água entre os diferentes tratamentos e ao longo do tempo nos dois ensaios (Tabelas 1, 2) que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando todos dentro do limite estabelecido para conservação da vida aquática (BOYD, 1982).

Tabela 1. Média das variáveis físico-químicas da água do ensaio I e ensaio II com *O. niloticus* expostas ao CuSO_4

ENSAIO I			
Tratamento ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Amônia não ionizada ($\text{mg NH}_3\text{L}^{-1}$)
Controle	71,41	118,73	0,01
0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	51,52	96,28	0,02
2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	72,82	117,30	0,01
ENSAIO II			
Tratamento ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	Amônia não ionizada ($\text{mg NH}_3/\text{L}$)
Controle	86,29	185,96	0,01
0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	56,56	139,20	0,01
2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	79,07	166,74	0,01

Tabela 2. Média e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água do ensaio I e ensaio II com *O. niloticus* expostas ao CuSO₄

ENSAIO I					
Tratamento (mg.L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido		T (°C)	pH	Cond. Elétrica µs/cm
	mg.L ⁻¹	%Sat			
Controle	7,09±0,45	81,7±3,33	22,39±1,72	7,69±0,23	286,41±19,3
0,5mg.L ⁻¹	7,25±0,39	83,90±2,71	22,63±1,62	7,73±0,10	234,70±21,7
2,0mg.L ⁻¹	7,11±0,42	82,28±3,17	22,58±1,61	7,82±0,13	271,41±16,97

ENSAIO II					
Tratamento (mg.L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido		T (°C)	pH	Cond. Elétrica µs/cm
	mg.L ⁻¹	%Sat			
Controle	6,70±0,85	77,43±8,06	23,26±1,82	7,70±0,18	326,26±40,84
0,5mg.L ⁻¹	6,86±0,84	80,89±8,10	23,40±1,76	7,65±0,15	224,98±27,57
2,0mg.L ⁻¹	6,87±0,95	80,30±8,44	23,30±1,73	7,80±0,12	250,98±28,60

5.2 Determinações de cobre

Na tabela 3 são apresentadas as concentrações reais de cobre determinadas na água dos ensaios I e II, é possível observar perda de cobre, que pode estar relacionada à adsorção às paredes dos tanques, precipitação, volatilização e acúmulo de cobre nos animais.

Tabela 3. Média da concentração de cobre determinada nas amostras de água no Ensaio I e Ensaio II

Tratamento	CuSO ₄ .5H ₂ O		Concentração de cobre determinada (mg.L ⁻¹)		
	Concentração nominal (mg.L ⁻¹)	Concentração de cobre na molécula (mg.L ⁻¹)	Ensaio I	Ensaio II Exposição	Ensaio II Recuperação
Controle	0	0	Nd	Nd	Nd
0,5 mg.L ⁻¹	0,5	0,13	0,05 ± 0,005	0,06 ± 0,017	Nd
2,0 mg.L ⁻¹	2,0	0,50	0,25 ± 0,02	0,33 ± 0,03	Nd

nd = não detectado.

A exposição ao cobre no ensaio I resultou em acúmulo significativo nos tecidos analisados, com exceção do músculo (Figura 8). A média de cobre determinada nas brânquias ao final de 30 dias foi de 1,08 e 2,52 $\mu\text{g.g}^{-1}$ nas concentrações 0,5 e 2,0 mg.L^{-1} , respectivamente. No fígado, foram determinados valores de 87,32 e 127,78 $\mu\text{g.g}^{-1}$ nos tratamentos 0,5 e 2,0 mg.L^{-1} , respectivamente. Além disso, para as brânquias, ocorreu diferença significativa entre as duas concentrações a partir dos 15 dias e também ao longo do tempo para a concentração 2,0 mg.L^{-1} .

No ensaio II, também ocorreu diferença significativa nos valores de cobre acumulados nos fígado e brânquias, entre os animais tratados e o controle aos 30 dias de exposição, em ambas as concentrações, com exceção do músculo (Figura 9). Nas brânquias, valores de 1,28 e 2,04 $\mu\text{g.g}^{-1}$, foram determinadas nos tratamentos 0,5 e 2,0 mg.L^{-1} , respectivamente. Entretanto, o nível de cobre registrado nesse órgão durante a recuperação no ensaio II não diferiu estatisticamente do grupo controle, sendo possível observar queda nas duas concentrações. Os valores registrados aos 30 dias de recuperação foram 0,87 e 1,13 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para os tratamento 0,5 e 2,0 mg.L^{-1} , respectivamente. Altos valores de cobre foram

registrados no fígado dos animais após 30 dias de exposição, 224,24 e 288,30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cobre nos tratamentos 0,5 e 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Ao contrário do que observado com as brânquias, elevados níveis de cobre no fígado persistiram durante a recuperação, diferindo do controle. Os valores registrados ao final da recuperação foram 285,28 e 342,08 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, nas concentrações 0,5 e 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

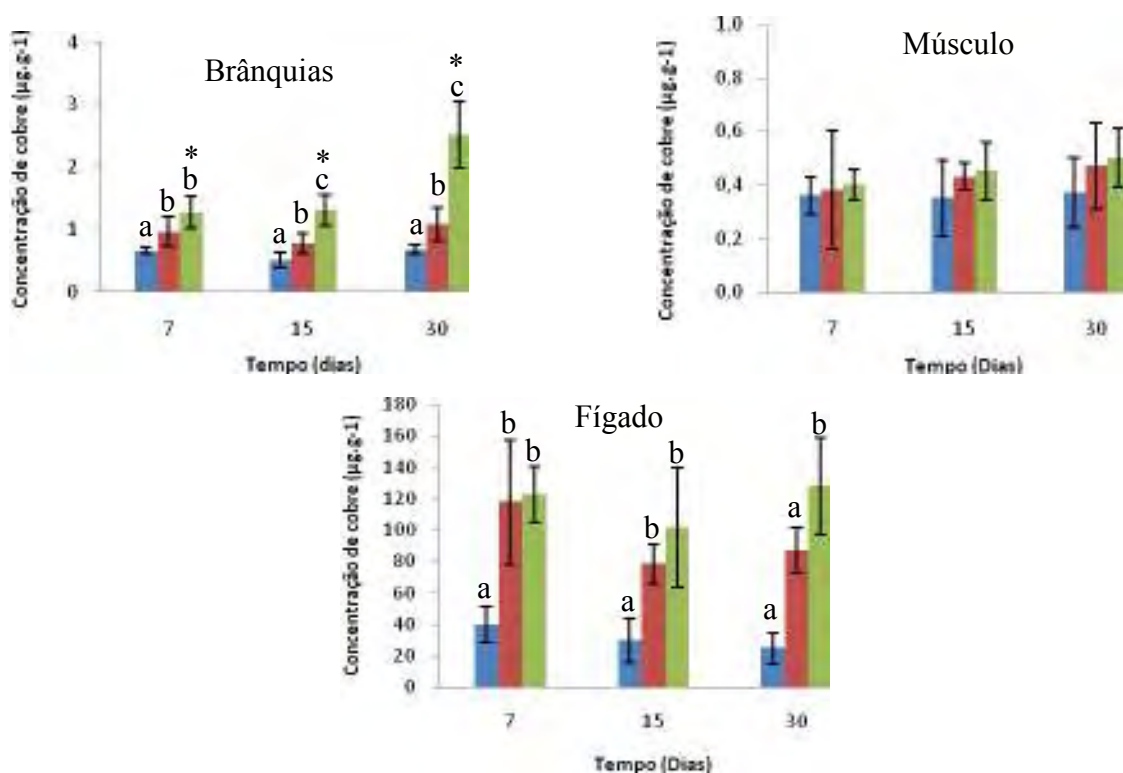


Figura 8 - Média e desvio padrão da concentração de cobre em tecidos de tilápia no Ensaio I. Letras distintas mostram diferença significativa entre os tratamentos, * diferença significativa entre os tempos de amostragem ($p < 0,05$). ■ controle ■ 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ■ 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

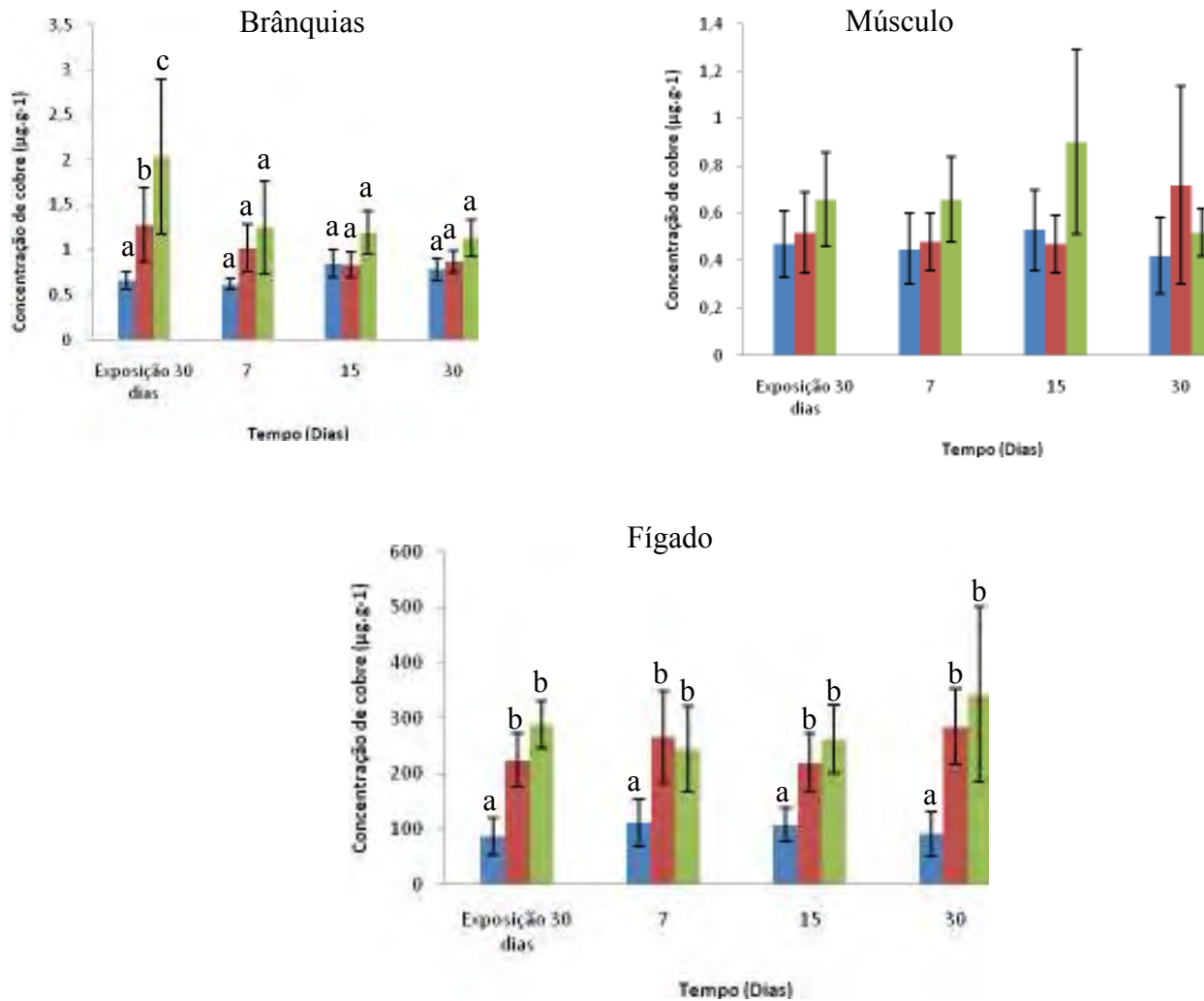


Figura 9 - Média e desvio padrão da concentração de cobre determinada em tecidos de tilápia no Ensaio II. Letras distintas mostram diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

■ controle ■ $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ■ $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

O acúmulo de cobre nos tecidos, como determinado no presente estudo, mostra uma relação direta com a concentração do metal no meio aquático, aumentando, em geral, a concentração nos tecidos com o aumento de cobre na água (MAZON e FERNANDES, 1999) e isto tem sido demonstrado em diversas espécies expostas ao cobre dissolvido na água (ÇOĞUN e KARGIN, 2004; MAZON *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 1997; PELGROM *et al.*, 1995, WONG *et al.*, 1999). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que os maiores valores de cobre foram encontrados no fígado,

seguido pelas brânquias e músculo, o mesmo padrão de distribuição de cobre nos tecidos de *O. niloticus* foi encontrado também por ÇOĞUN e KARGIN (2004).

Sabe-se que metais pesados acumulados em elevados níveis podem ser altamente tóxicos para peixes, especialmente para larvas e juvenis que são mais sensíveis à poluição. Órgãos alvos, como fígado, gônadas, rins e brânquias são tecidos metabolicamente ativos e acumulam metais pesados em altos níveis (QIAO-QIAO, *et al.*, 2007). Portanto, não é surpresa que nas brânquias e fígados da tilápia foram encontrados níveis elevados deste elemento.

A absorção de um químico pelas brânquias pode ser descrita da seguinte maneira: (1) absorção através do epitélio das brânquias; (2) transporte do epitélio para o sangue; (3) incorporação no sangue, incluindo ligação às proteínas do plasma; (4) transporte via sistema circulatório para vários tecidos; (5) transporte dentro dos tecidos (fígado, rim e músculo, por exemplo) (KLEINOW *et al.*, 2008). No presente estudo, as concentrações de cobre registradas indicaram que esse processo foi seguido, com entrada do xenobiótico através das brânquias e distribuição para o fígado e em menor quantidade para o músculo.

A absorção de cobre é passiva e envolve um gradiente de difusão do meio externo (aquático) para o meio interno (tecidos) (HEATH, 1991). As brânquias são consideradas os principais sítios de absorção de cobre dissolvido no meio aquático. Este órgão, responsável pela respiração, possui extensa superfície em contato com o meio aquático, uma fina membrana separando o sangue e a água, e altas taxas de troca entre sangue e água. Essas mesmas características que promovem eficiente troca de gases respiratórios, também contribuem para a entrada de xenobióticos (KLEINOW *et al.*, 2008)

De acordo com LEVINA *et al.* (1972), a distribuição desigual de metais pesados deve-se à diferenças no grau de intensidade de processos metabólicos das células em órgãos e tecidos. Quando um

metal acumula em quantidades excessivas em órgãos vitais, eles devem indubitavelmente alterar vários aspectos de sua atividade vital.

As brânquias e o fígado de *O. niloticus* acumularam altas concentrações de cobre. Entretanto, o maior acúmulo de cobre foi registrado no fígado, e esse resultado está provavelmente relacionado ao papel desse órgão como o principal armazenador e regulador na homeostase do cobre, refletindo sua ação multifuncional nos processos de detoxificação (CARPENÈ e VASÁK, 1989). O alto conteúdo de cobre no fígado pode indicar, ao menos em parte, uma proteção aos outros órgãos do acúmulo excessivo de cobre (GROSSEL *et al.*, 2001).

O acúmulo de cobre nas brânquias foi menor que o registrado no fígado, sugerindo que parte do cobre absorvido nas brânquias foi continuamente para a corrente sanguínea e transportado para outros órgãos. Estudos que determinam o local dos contaminantes nos tecidos, em geral, mostram maior concentração de cobre no fígado quando comparado com as brânquias (BERVOETS *et al.*, 2009; KRAEMER *et al.*, 2005; WONG *et al.* 1999; EWERS e SCHLIPKOTER, 1991; BENDELL-YOUNG *et al.*, 1986).

Os resultados mostraram aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias ao longo do tempo na maior concentração ($2,0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), indicando resposta tempo-dependente. Outros autores relataram o mesmo padrão de resposta, tais como, KRAEMER *et al.* (2005) e ÇOĞUN e KARGIN (2004) que observaram aumento na concentração de cobre nas brânquias de *Perca flavescens* e *O. niloticus*, respectivamente, quando expostos a esse contaminante ao longo do tempo. Além disso, nesse tecido ocorreu acumulação concentração-dependente a partir dos 15 dias de exposição. Resultado semelhante foi encontrado por PELGRON *et al.* (1995) e WONG *et al.* (1999) onde o acúmulo de cobre nas brânquias do peixe *Sparus sarba* foi mais proeminente nas maiores concentrações de cobre. A alta concentração de cobre nas brânquias pode ser devido à ligação do cobre ao muco das lamelas branquiais

(WONG *et al.* 1999). Embora, não significativo, o fígado parece também apresentar um padrão de resposta de acúmulo de cobre tempo-dependente e concentração-dependente.

O acúmulo de cobre em tecidos, como o músculo, ocorre quando a capacidade máxima de armazenamento do fígado é exarcebada (LAURÉN E McDONALD, 1987). No presente estudo não ocorreu diferença na concentração de cobre entre os tratamentos. Em geral, a concentração de cobre é menor no músculo do que em outros tecidos (WONG *et al.*, 1999). Por outro lado, o baixo conteúdo de metal em músculo é um parâmetro importante a ser investigado em uma perspectiva de cadeia trófica, onde o homem é o consumidor final (LWANGA *et al.*, 2003).

O nível máximo de cobre permitido em alimentos é de $30\mu\text{g.g}^{-1}$ (Portaria 685/98 SNVS/MS). Entretanto, esse limite está estabelecido para alimentos em geral, não existindo uma determinação específica para peixes. Os valores de cobre determinados no músculo, inclusive no grupo controle, ficaram abaixo de $30\mu\text{g.g}^{-1}$, mas é preciso cautela, uma vez que por processos como biomagnificação e bioacumulação, concentrações maiores podem ser encontradas, o consumo de peixes contaminados por cobre podem representar riscos à saúde.

Os níveis de cobre nas brânquias dos animais expostos retornaram a valores próximos ao controle na fase de recuperação, mas os níveis de cobre hepático permaneceram altos pós-exposição (Figura 11), resultado similar foi encontrado por SHAW e HANDY (2006) em *O. niloticus* alimentadas com níveis subletais de cobre, após 21 dias de recuperação. E estes autores, sugerem que a tilápia pode redistribuir o cobre acumulado para excreção via fígado. A rota dominante para excreção de cobre em peixes teleósteos parece ser através do sistema hepatobiliar, predominando sobre a excreção renal e branquial (GROSELL *et al.*, 2001; CLEARWATER *et al.*, 2002). No presente estudo, os valores de cobre determinados ao final de 30 dias de recuperação do ensaio II no fígado, foram maiores que os

registrados aos 30 dias de exposição, sugerindo que após cessar a exposição, o cobre acumulado em diferentes órgãos, como brânquias e rim é mobilizado para o fígado, onde é então excretado

A biotransformação de um composto químico pode aumentar substancialmente sua através da bile, por aumentar sua solubilidade. A quantidade de metabólitos encontrados na bile parece ser espécie-dependente. Além disso, o fato de metais serem excretados conjugados a moléculas pode interferir na sua eliminação, fato esse que sugere potencial seletividade das vias de eliminação de metabólitos. No caso de metais pesados como o cobre, o qual se liga à glutatona, a eliminação via sistema hepatobiliar pode ser reduzida, devido à inibição da biosíntese da glutatona ou de sua excreção via bile (BALLATORI e BOYER, 1986). Portanto, isso poderia explicar a alta concentração de cobre no fígado, mesmo após os animais serem colocados em água livre de cobre. Embora, o fígado seja a principal rota de excreção de cobre, a maneira como o cobre é excretado (ligado a moléculas como a glutatona), poderia inibir a excreção desse metal.

O tempo de recuperação utilizado no presente estudo talvez não tenha sido suficiente para a total eliminação de cobre dos órgãos, principalmente do fígado. BOOCK e MACHADO-NETO (2000) registraram eliminação quase completa desse metal em peixes expostos a 96 horas ao oxicloreto de cobre e posteriormente colocados em água limpa por 144 horas. Entretanto, esses autores analisaram o organismo todo. No presente trabalho não houve eliminação de cobre nos tecidos analisados.

5.3 Análises Hematológicas

No presente estudo, com relação às análises hematológicas não houve diferença significativa para os parâmetros hematológicos e para os índices hematimétricos entre os peixes dos tratamentos no ensaio I e II (Figuras 10 e 11).

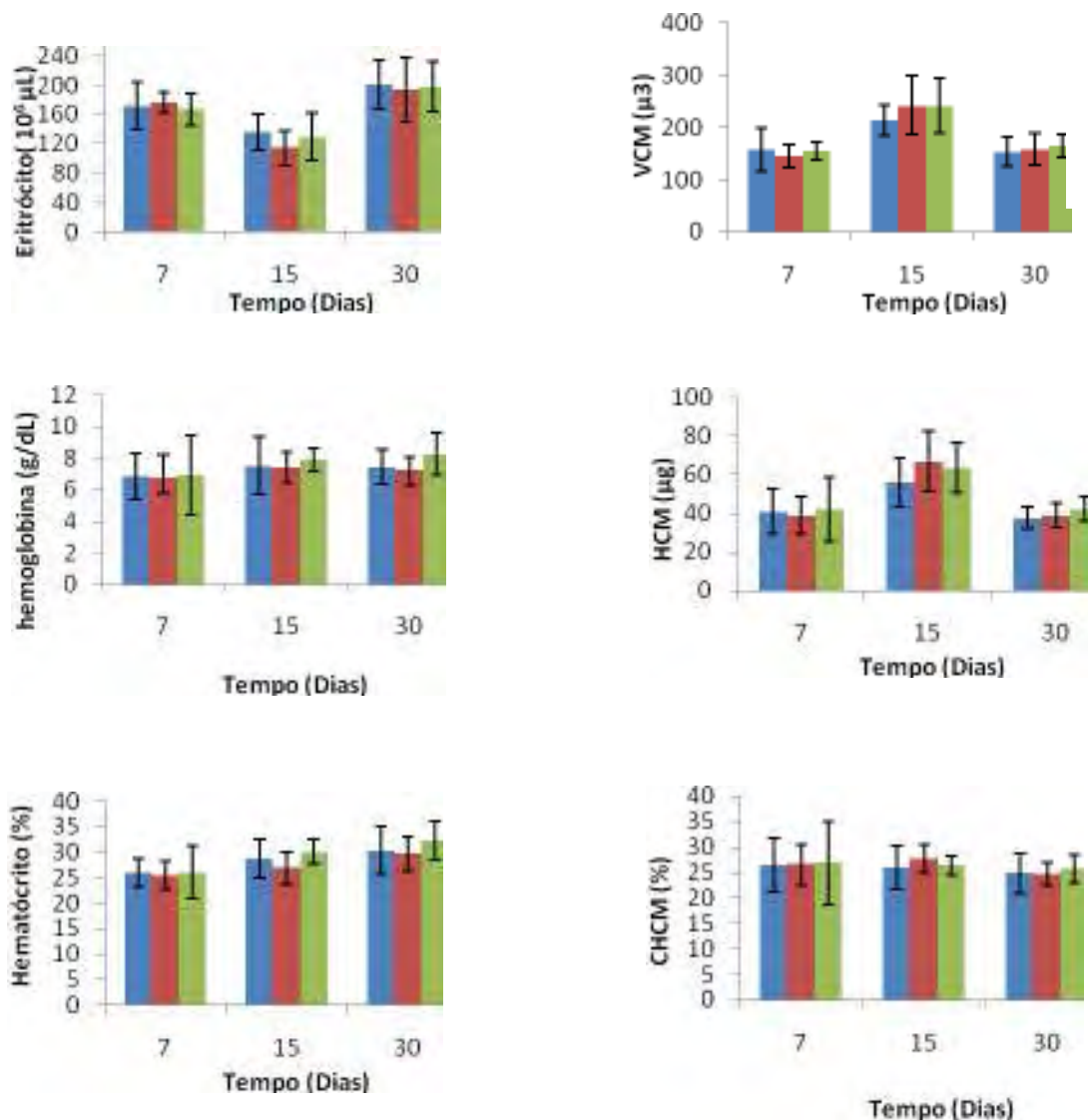


Figura 10 - Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de tilápias, expostas as concentrações subletais de sulfato de cobre, nos diferentes momentos de coleta no Ensaio I
 ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

As alterações do quadro hematológico podem ser bons indicadores da resposta fisiológica frente às variações ambientais, porque peixes vivem associados com seu ambiente externo e são muitas vezes sensíveis a mudanças que podem ocorrer dentro do ambiente (VAN VUREN, 1994).

No ensaio I é possível observar, diminuição no número de eritrócitos na coleta de 15 dias, inclusive no grupo controle. Entretanto, aos 30 dias o número de eritrócitos aumentou, ficando maior

que aos sete dias de exposição. Esse aumento no número de eritrócitos, embora não significativo, após 30 dias de exposição em todos os tratamentos, inclusive no grupo controle pode significar uma adaptação dos animais ao estado de confinamento, seria um processo de retorno às condições fisiológicas normais (NUSSEY *et al.*, 1995). Os valores de hematócrito e taxa de hemoglobina apresentaram pequena variação entre os tratamentos e ao longo do tempo permanecendo estáveis durante todo o período experimental.

No ensaio II, assim como no ensaio I não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 13), quando comparados com o grupo controle os valores dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos permaneceram próximos ao grupo controle nos animais expostos a diferentes concentrações de cobre, tanto aos 30 dias de exposição, quanto nos tempos de coleta, durante a depuração. Estes resultados indicam que o cobre no presente estudo não provocou alterações sanguíneas significativas nos animais.

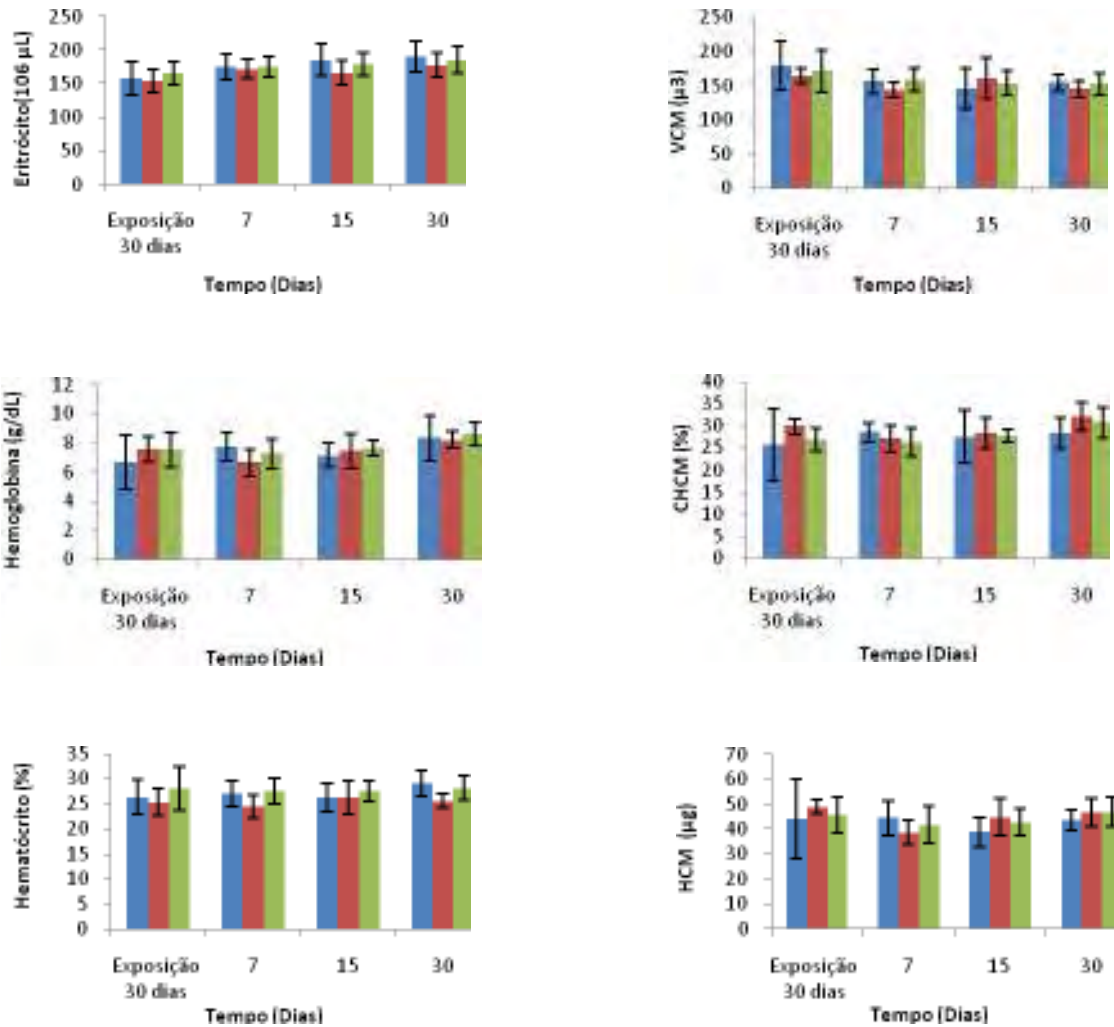


Figura 11 - Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta durante a depuração no Ensaio II. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

NUSSEY *et al.* (1995) também não encontraram alterações nas variáveis hematológicas e índices hematimétricos na tilapia, *O. mossambicus*, expostas ao cobre por quatro semanas, e somente os valores de hematócrito apresentaram diminuição após 96 horas de exposição, já para os índices hematimétricos os autores relataram alteração no VCM, HCM e CHCM. Alguns trabalhos relatam a ocorrência de alterações hematológicas devido à exposição ao cobre, em *Heteropteneus fossilis* ocorreu redução no número de eritrócitos e taxa de hemoglobina após 30 dias de tratamento (SINGH e REDDY, 1990). Por

outro lado em *Channa punctatus* foi observado decréscimo na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito e do CHCM, mas aumento do VCM (SINGH, 1995). Tais alterações nessas espécies devem-se à danos no tecido eritropoiéticos provocados pelo tratamento (WEPENER *et al.*, 1992; EL-AZIZ, 1997). Outros autores também relataram alterações sanguíneas devido à exposição ao cobre (NUSSEY *et al.*, 1995; TAVARES –DIAS *et al.*, 2002). Entretanto, no presente trabalho, não foi evidenciado nenhuma alteração na série vermelha de peixes expostos ao sulfato de cobre por até 30 dias que pudesse evidenciar o efeito deste sobre os parâmetros hematológicos.

No sangue periférico de *O. niloticus* os leucócitos encontrados foram de três tipos, monócitos, linfócitos e neutrófilos. Não foram observados eosinófilos nos peixes em nenhum dos tratamentos testados, já os basófilos foram encontrados apenas em dois animais do grupo controle e uma na concentração de $0,5\text{mg.L}^{-1}$. Segundo RANZANI-PAIVA (1995), o relato esporádico de um tipo ou outro de leucócitos pode ser atribuído à pequena porcentagem destas células no sangue, podendo muitas vezes passar despercebido.

Mudanças na contagem diferencial de leucócitos fornecem evidência do decréscimo da imunidade não específica em peixes após a exposição a substâncias tóxicas (SVOBODA *et al.*, 2003; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Neste estudo, não foram observado alterações significativas na contagem diferencial de leucócitos nos peixes de ambos os tratamentos, durante todo o período de exposição e em ambos os ensaios (Figuras 12 e 13). Da mesma forma não ocorreu diferença na contagem total de leucócitos.

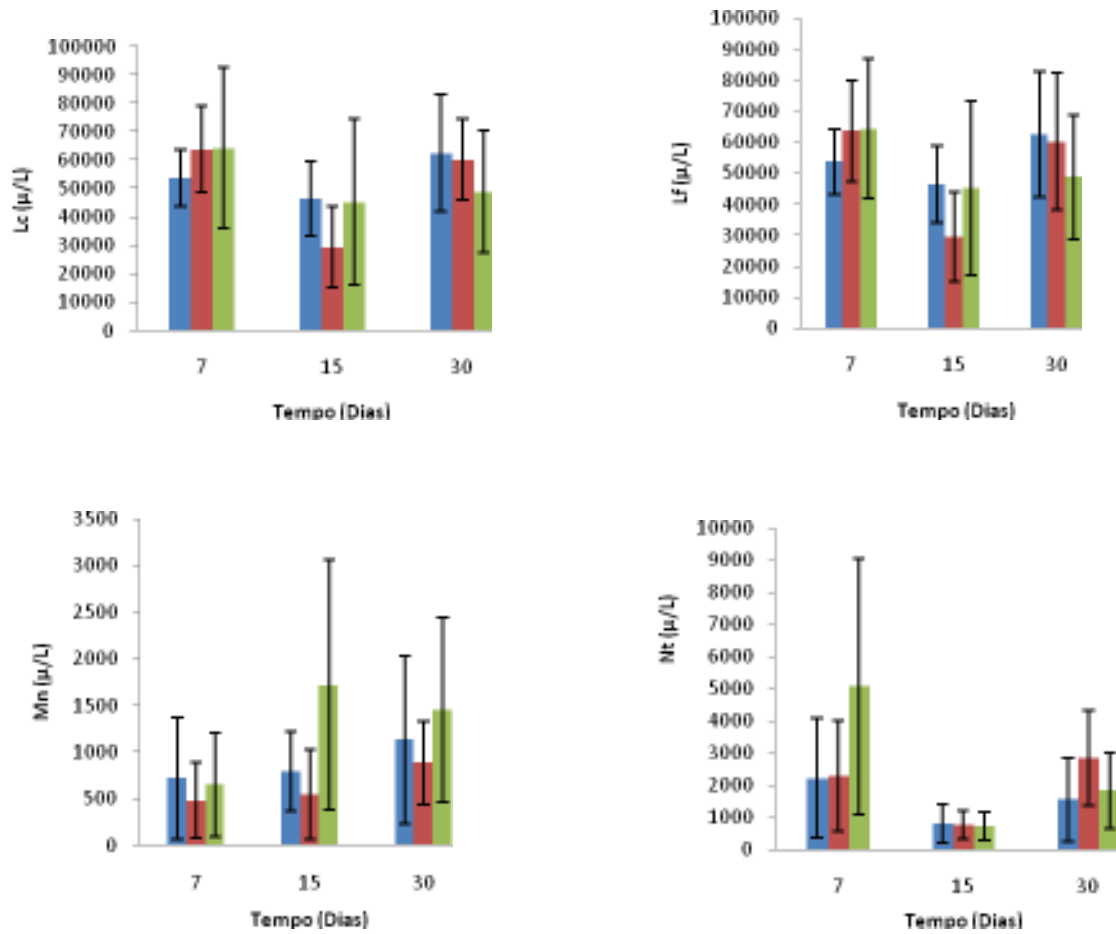


Figura 12 – Médias e desvio padrão da contagem diferencial e total de Leucócitos no ensaio I de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao sulfato de cobre (CuSO_4). (Lc= Leucócitos; Lf= Linfócitos; Nt= Neutrófilos; Mn= Monócitos). ■ controle ■ $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ■ $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$

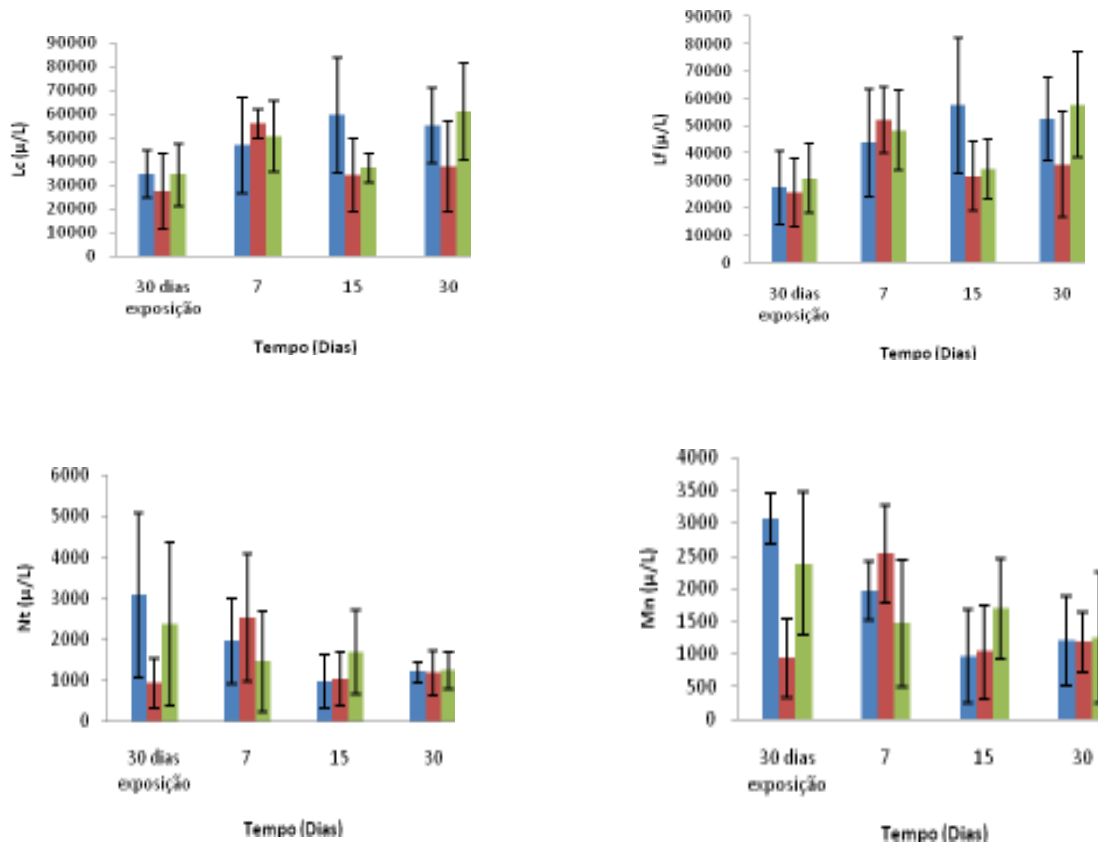


Figura 13 – Médias e desvio padrão da contagem diferencial e total de Leucócitos no ensaio II de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao sulfato de cobre (CuSO₄). (Lc= Leucócitos; Lf= Linfócitos; Nt= Neutrófilos; Mn= Monócitos). ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

Alterações causadas pelo cobre em leucócitos de peixes já foram observadas por NUSSEY *et al.* (1995). Segundo esses autores o cobre provocou aumento na concentração de leucócitos, com aumento no número de linfócitos e eosinófilos e diminuição nos monócitos e neutrófilos. Entretanto no presente trabalho o cobre não causou alteração nos leucócitos dos peixes. Resultado similar foi encontrado por TAVARES-DIAS *et al.* (2002), que relataram não ter ocorrido alterações na contagem diferencial de leucócitos em peixes expostos ao cobre. Embora o aumento do número de leucócitos seja uma reação normal dos peixes à substâncias estranhas (NUSSEY *et al.*, 1995), no presente estudo tal reação não foi observada.

As funções dos trombócitos em peixes são pouco conhecidas, entretanto, acredita-se na possibilidade de estarem relacionadas com o sistema de defesa, como relatado por MATUSHIMA e MARIANO (1996). No presente estudo, não houve diferença significativa no número de trombócitos entre os diferentes tratamentos quando comparados com o grupo controle e esse resultado foi observado em ambos os ensaios (Figura 14). Após o tratamento com metais pesado ocorre trombocitopenia e leucopenia em *Oreochromis niloticus* (ALKAHEN, 1994). Esse fenômeno é provocado por necrose do tecido leucopoiético (SINGH e REDDY, 1990; WEPENER *et al.*, 1992). Entretanto, esse fenômeno não foi observado no presente estudo e os peixes não apresentaram alterações no percentual de trombócitos.

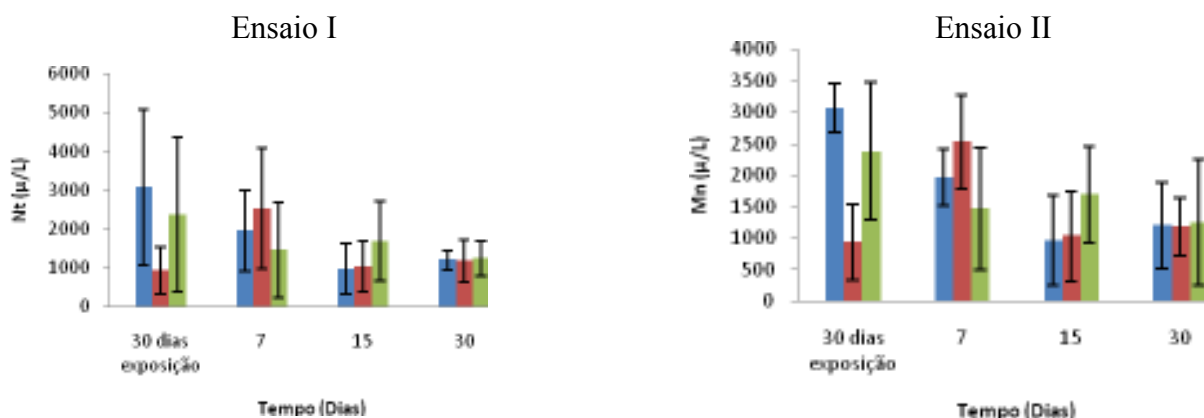


Figura 14 - Média da contagem total de trombócitos no ensaio I e II de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao sulfato de cobre (CuSO_4). Tr = Trombócitos.

■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

5.4 Análises Imunológicas

A fagocitose é uma defesa celular não específica do sistema imune inato e os macrófagos tem papel importante nesse mecanismo, protegendo o hospedeiro através da fagocitose de material estranho.

O sistema fagocítico consiste de macrófagos fixos, residentes ou células como macrófagos presentes em todos os compartimentos do corpo e que, portanto, possui um papel importante no estágio inicial de infecções, e também são os primeiros fagócitos a encontrar o microorganismo invasor (DO VALE *et al.*, 2002).

A habilidade de fagocitar de um macrófago reflete o funcionamento dessa célula, portanto, é interessante conhecer o efeito de um poluente ambiental na resposta dos macrófagos (WEEKS *et al.*, 1986). No presente trabalho é possível observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no ensaio I entre o controle e a concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ aos 15 dias e aos 30 dias para a capacidade fagocítica dos macrófagos (Figura 15), sendo que esta foi de 42,33 e 43,33% aos 15 e 30 dias de coleta respectivamente para a concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e 65,33 e 63,00% aos 15 e 30 dias, respectivamente para o grupo controle. Porém, não houve diferença aos sete dias, sendo que os valores foram de 62,33 para o controle e 61,57% para a concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Já os valores dos exemplares mantidos na concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ não diferiu do grupo controle em nenhum tempo de coleta no Ensaio I e os valores da capacidade fagocítica foram 63,00, 51,67 e 50,83% nos tempos sete, 15 e 30 dias.

Na figura 16 são mostrados graficamente os resultados da capacidade fagocítica do ensaio II. Diferente do ensaio I, no ensaio II não houve diferença significativa entre os tratamentos. Houve queda acentuada na capacidade fagocítica aos 7 dias de depuração nos macrófagos da concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CuSO}_4$. Entretanto, essa queda não deve estar relacionada ao tratamento. Além disso, nas coletas seguintes, esse indicador aumentou para todos os tratamentos, inclusive no grupo controle. A coleta realizada aos 30 dias de depuração apresentou os maiores valores de capacidade fagocítica. Esse aumento pode ser devido à adaptação dos animais ao confinamento.

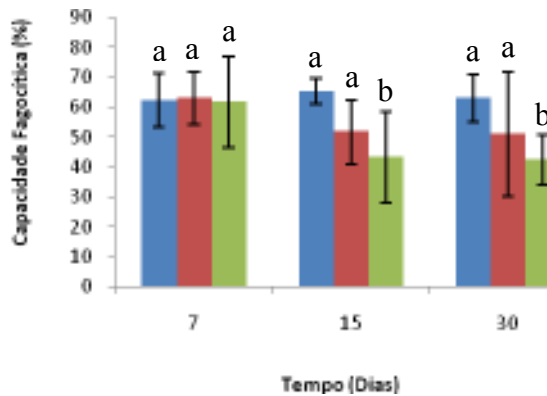


Figura 15 - Capacidade fagocítica de macrófagos de tilápias, *O. niloticus*, após exposição às concentrações subletais de sulfato de cobre, nos diferentes momentos de coleta no ensaio I.

OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

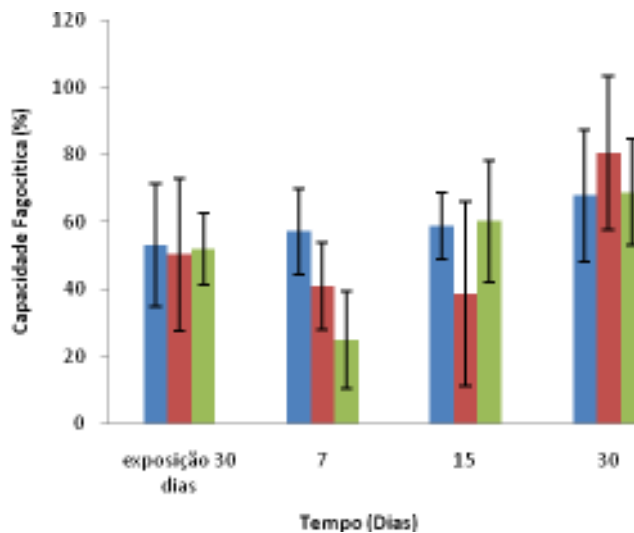


Figura 16 - Capacidade fagocítica de macrófagos de tilápias, *O. niloticus*, após exposição às concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta durante a depuração no ensaio II. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

A diminuição da capacidade fagocítica nos animais expostos à concentração 2,0 mg.L⁻¹, no ensaio I resultou em alteração do sistema imune. ROUGIER *et al.* (1994) encontraram o mesmo

resultado em macrófagos do rim de *Brachydanio rerio* expostos ao cobre por sete dias. O efeito inibitório na fagocitose de macrófagos de peixes, como mostrado no presente estudo, também já foi registrado por BENNANI *et al.* (1995), em células do rim anterior de *Dicentrarchus labrax* e por KHANGAROT e TRIPATHI (1991) em catfish expostos a concentração de $0,32\text{mg.L}^{-1}$ de cobre. Por outro lado, DETHLOFF e BAILEY (1998) não encontraram efeito na fagocitose de macrófagos do rim de *Oncorhynchus mykiss* expostos ao mesmo metal. As diferenças nos resultados da atividade fagocítica, em peixes expostos ao cobre, podem ser devido às diferenças na dosagem utilizada, período de exposição e espécie utilizada. A levedura *S. cerevisiae* estimula a migração de macrófagos para a cavidade abdominal (BERNARD, *et al.*, 2002). Portanto, a diminuição da capacidade fagocítica nos macrófagos dos peixes expostos a concentração de $2,0\text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 demonstrou que nessa concentração o cobre causou alteração no sistema imunológico dos animais. Resultados similares foram encontrados por diversos autores em peixes expostos a concentrações subletais de cobre (SHARIFF *et al.*, 2001; ELLIS, 1981; KNITTEL, 1981).

Os lisossomos possuem um papel importante no funcionamento de células eucarióticas, particularmente de células especializadas como os macrófagos (ROMEO *et al.*, 2000). A diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos dos peixes da concentração $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 pode ser atribuída ao fato de que íons metais podem modificar a atividade lisossomal celular e, portanto, alterar diretamente a atividade fagocítica dos macrófagos (VIARENGO *et al.*, 1989). Os pseudópodos dos macrófagos reconhecem certos compostos químicos liberados por agentes patógenos e após o contato, os antígenos os reconhecem como agente estranho e através de receptores de membrana específicos ou não específicos, são englobados por fusão dos pseudópodos, formando vesículas fagocíticas (BENNANI *et al.*, 1995). Entretanto, os metais pesados podem agir sobre a actina, que está envolvida no mecanismo de extensão dos pseudópodos dos macrófagos, o que os tornariam menos aptos a realizar fagocitose

(VIARENGO *et al.*, 1989) interrompendo o processo descrito acima. A participação relativa de cada fagócito no mecanismo de defesa contra infecções dependerá da oportunidade de encontrar o agente infeccioso invasor (DO VALE *et al.*, 2002). Talvez o cobre interfira também no reconhecimento dos agentes patogênicos pelos macrófagos, alterando conseqüentemente a atividade fagocítica. Manifestações toxicológicas no sistema imune após a exposição à xenobióticos em experimentos com animais podem ser devido a mudanças no peso dos órgãos linfóides, histologia e mudanças na celularidade do tecido linfóide e número de leucócitos periféricos (DESCOTES, 1986).

Além de mudanças na atividade fagocítica dos macrófagos como registrado no presente trabalho, o cobre pode causar outras mudanças no sistema imunológico de peixes como alterações na lisozima, imunoglobulina total, e proteína total (SHARIFF *et al.*, 2001).

De acordo com ROUGIER *et al.* (1994) o cobre causa diminuição concentração-dependente em respostas de macrófagos. Tal observação pode ser aplicada no presente trabalho, uma vez que, houve diferença significativa apenas na maior concentração, enquanto que na concentração $0,5\text{mg.L}^{-1}$ os resultados não mostraram haver diferença significativa entre a capacidade fagocítica quando comparada com o controle.

De acordo com os resultados obtidos, não ocorreu diferença para a capacidade fagocítica na primeira coleta (sete dias) para a concentração $2,0\text{ mg.L}^{-1}\text{ CuSO}_4$, indicando que no presente estudo o sistema imune pôde suportar a exposição rápida. Entretanto, a exposição crônica ao sulfato de cobre nessa concentração causou alteração do sistema imune, o que foi verificado pela redução da capacidade fagocítica aos 15 e 30 dias de exposição no Ensaio I.

O índice fagocítico fornece informação á respeito da quantidade de agente estranho que cada macrófago ativo foi capaz de fagocitar através da contagem do número de leveduras dentro de uma dada célula, porém no presente estudo não houve diferença significativa entre os tratamentos para este

indicador em ambos os ensaios (Figuras 17 e 18). Esse resultado sugere um mecanismo de compensação, ou seja, devido ao menor número de macrófagos ativos nos animais expostos ao cobre, as células ativas fagocitaram um maior número de leveduras, o que eleva o índice fagocítico para valores próximos ao controle.

A sensibilidade da tilápia *Oreochromis niloticus* em estudos de imunotoxicidade foi demonstrada por GIRON-PEREZ *et al.* (2007), onde essa espécie apresentou efeito negativo na capacidade fagocítica quando exposta ao pesticida organofosforado diazina.

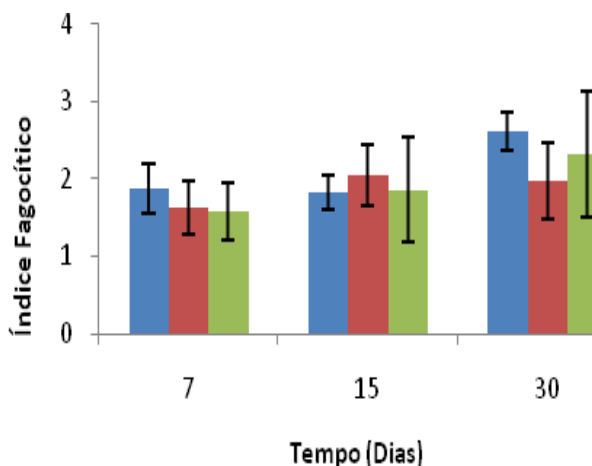


Figura 17 - Índice fagocítico de macrófagos de tilápias, *O. niloticus*, expostas às concentrações subletais de sulfato de cobre, nos diferentes momentos de coleta no ensaio I.
■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

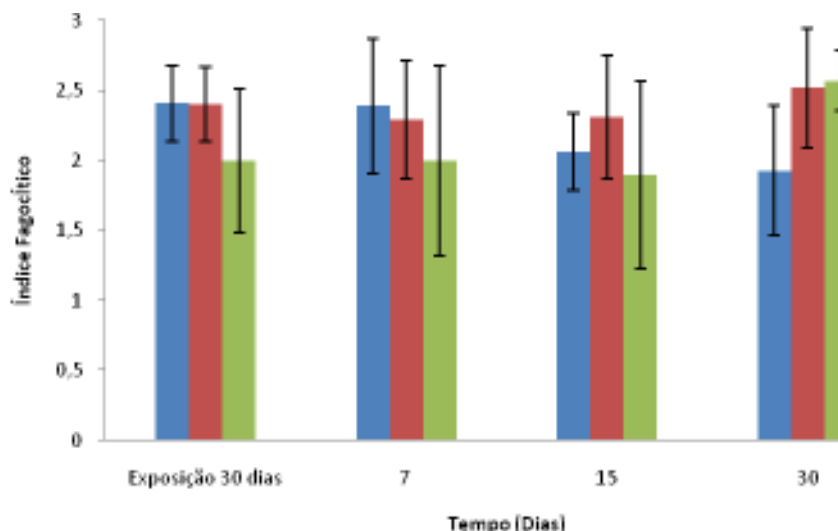


Figura 18 - Índice Fagocítico de macrófagos de tilápias, *O. niloticus*, expostas às concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta durante a depuração no ensaio II. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

5.5 Análises Bioquímicas

A GST é uma enzima de fase II no metabolismo de detoxificação, ela é responsável pela ligação da glutathione a xenobióticos e seus metabólitos (ALMAR *et al.*, 1998). De acordo com os nossos resultados não houve diferença significativa para a atividade da GST entre os tratamentos no ensaio I (Figura 19) e também no ensaio II (Figura 20). Resultado similar foi encontrado por SANCHEZ *et al.* (2005), no fígado de peixes expostos ao cobre por até 21 dias. Já PARIS-PALACIOS (2000), registraram aumento na atividade da GST em peixes expostos ao cobre.

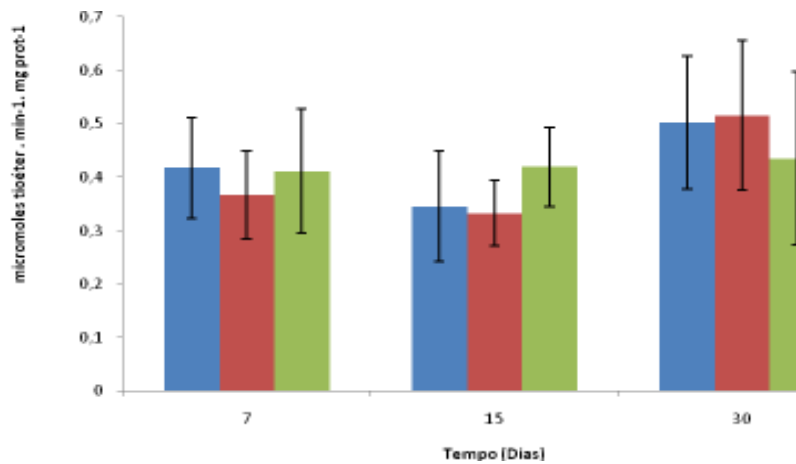


Figura 19 - Atividade específica das GST no fígado de tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre nos diferentes momentos de coleta no ensaio I. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

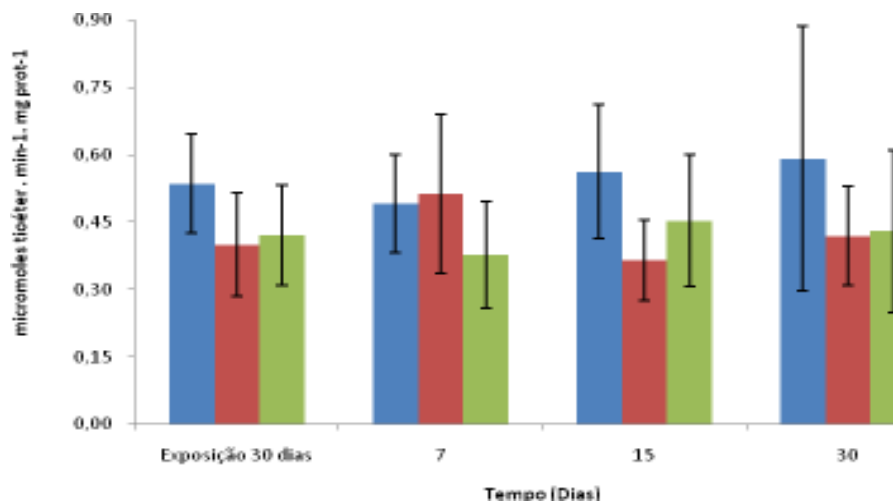


Figura 20 - Atividade específica das GST no fígado de tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta da depuração no ensaio II. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

A glutathiona atua direta e indiretamente em processos biológicos como mecanismos de proteção celular (MEISTER *et al.*, 1983). Problemas na síntese e metabolismo da glutathiona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis desse tripeptídeo e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DENEKE e FANBURG, 1989). Mudanças na concentração desse tripeptídeo pode indicar desordens fisiológicas causadas pela administração de algumas drogas oxidantes (HALL e MALIA, 1986). Neste estudo, ocorreu queda significativa na concentração de GSH nas duas concentrações de sulfato de cobre testadas, quando comparadas ao grupo controle, em todos os tempos de coleta no ensaio I (Figura 21). O mesmo resultado foi observado no ensaio II, onde a concentração de GSH foi significativamente menor nos grupos expostos ao cobre, quando comparadas ao grupo controle aos 30 dias de exposição (Figura 22). Após 30 dias de recuperação, a depleção de GSH foi mantida, ou seja, mesmo tendo sido tirados da condição de exposição ao cobre, os animais ainda continuaram a sofrer os danos do metal. Esse resultado pode ter acontecido devido ao acúmulo de cobre no fígado.

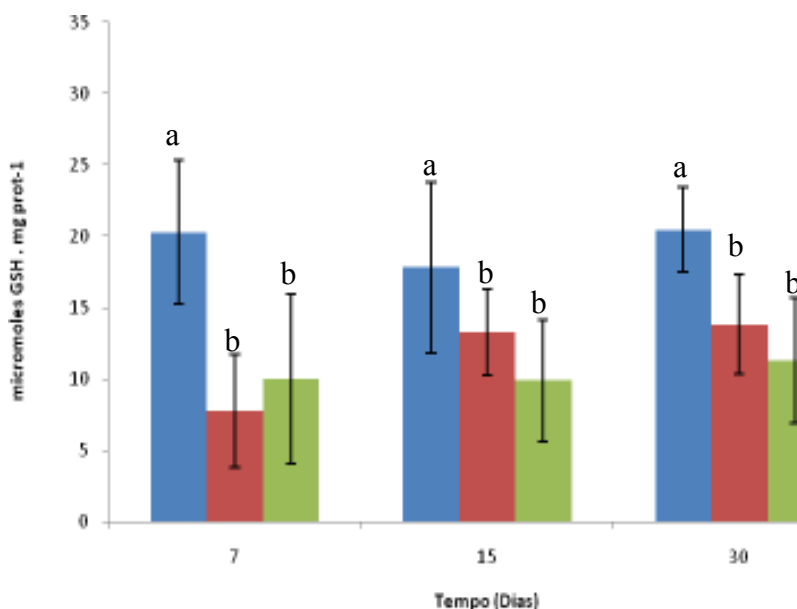


Figura 21 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) em fígado de tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre nos diferentes momentos de coleta. Letras distintas indicam diferença significativa. ($p < 0,05$). ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

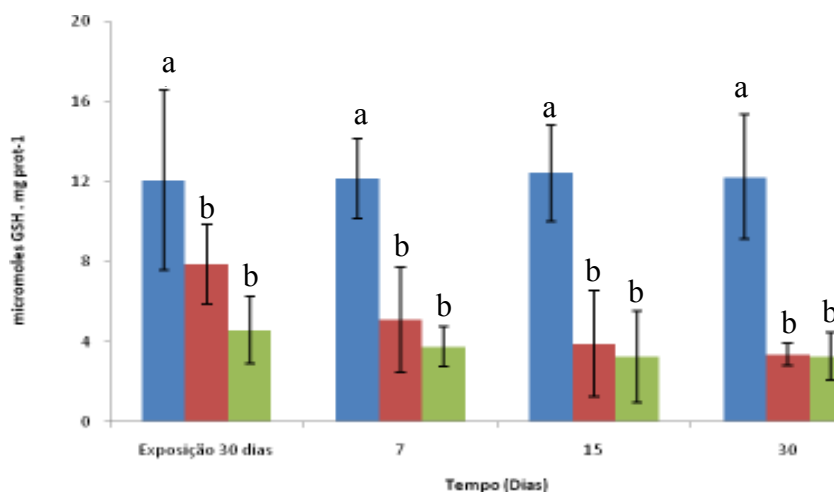


Figura 22 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) em fígado de tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta da depuração. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

SANCHEZ *et al.* (2005), observaram depleção de GSH em peixes na primeira semana de exposição ao cobre, mas a partir do oitavo dia de exposição outro sistema de detoxificação foi induzido, fazendo com que os níveis de GSH aumentassem, ficando próximos aos peixes do grupo controle. O resultado encontrado pelo autor acima citado contrasta com os apresentados neste estudo para o ensaio I, onde a depleção de GSH permaneceu até 30 dias de exposição sugerindo que não houve a indução de outro sistema de detoxificação, que pudesse remover espécies reativas de oxigênio.

As enzimas antioxidantes, em peixes, podem ser inibidas ou induzidas pelo cobre de acordo com a dose, espécie e rota de exposição (SANCHEZ *et al.*, 2005). Portanto, essa diferença pode ser devido às diferentes espécies utilizadas e principalmente devido à dose, uma vez que a concentração utilizada no presente trabalho foi de 2,5 a 10 vezes maior. No presente estudo houve diminuição de GSH durante exposição e recuperação no ensaio II, isso pode ter acontecido porque altos níveis de cobre hepático foram registrados até 30 dias de recuperação. PARIS-PALACIOS *et al.* (2000), mostraram aumento da glutathiona em peixes expostos ao cobre, e ao fim do período de recuperação registraram valores ainda altos da glutathiona, quando comparado com o grupo controle, embora tenham sido resultados contrários com relação ao nível de GSH, ambos os estudos, demonstraram a dificuldade da GSH voltar a níveis basais mesmo em água limpa.

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A diminuição da GSH no presente estudo sugere a caracterização do estresse oxidativo, indicando que o cobre nas concentrações testadas promoveu aumento dos agentes oxidantes. A função do cobre como promotor de estresse oxidativo é bem descrita, justamente, por esse metal ser

catalisador, durante o seu ciclo redox, na formação de espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila (OH^\bullet) (MATES *et al.*, 2000).

A glutatona reduzida é considerada a primeira linha de defesa celular contra metais por quelação e detoxificação destes (SIES, 1999). A inibição da GSH, nos dois ensaios realizados, parece estar relacionada à habilidade do cobre de interagir com GSH, formando uma ligação estável GS-Cu(I) (SANCHEZ, *et al.*, 2005), o que causaria efeito inibitório no sistema de regeneração da GSH, isto é, sobre a GSH-redutase e GSH-sintetase (CANESI *et al.*, 1999). Essa ligação da GSH ao cobre acontece porque essa molécula possui cisteína em sua seqüência e o radical sulfidrila da cisteína funciona como um ligante para íons metálicos (DAMERON e HARRISON, 1998). A proteção assegurada pelo GSH às células deve decorrer da neutralização de EROs originadas durante a interação celular com o cobre e da redução da concentração intracelular de cobre, uma vez que esse xenobiótico é excretado na forma de um conjugado com peptídeos (DAMERON e HARRISON, 1998).

Sabe-se que a GST, é capaz de ligar xenobióticos a GSH, entretanto o cobre não é conjugado a GSH pela enzima GST (PARIS- PALACIOS *et al.*, 2000). Portanto, mesmo não tendo havido diferença nos níveis de GST entre os tratamentos, esse resultado não interferiu na ligação do cobre a GSH.

Essa diminuição na concentração de GSH pode indicar alterações do estado antioxidante dos animais e aumento do estresse oxidativo. A GSH é convertida em glutatona oxidada (GSSG) durante a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, reação que é catalisada pela glutatona peroxidase (GSH-Px) e pela catalase (CAT). Essas enzimas são importantes no sistema antioxidante, removendo H_2O_2 , que é um metabólito extremamente deletério (ROVER-JUNIOR *et al.*, 2001). No presente estudo, a atividade da GSH-Px não foi avaliada, mas pode-se sugerir aumento da atividade dessa enzima, em virtude da redução da GSH. Por outro lado, a atividade da CAT foi avaliada. É

possível observar nas figuras 23 e 24 que, não houve diferença significativa entre as concentrações de sulfato de cobre testadas e o grupo controle em ambos os ensaios.

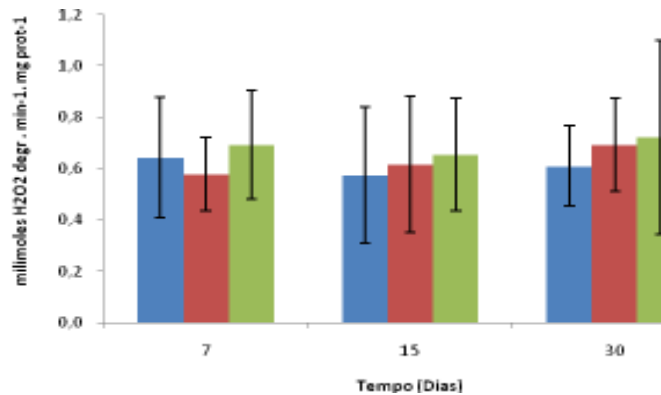


Figura 23 - Atividade específica da catalase em fígado de tilápias, *O. niloticus*, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre nos diferentes momentos de coleta. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

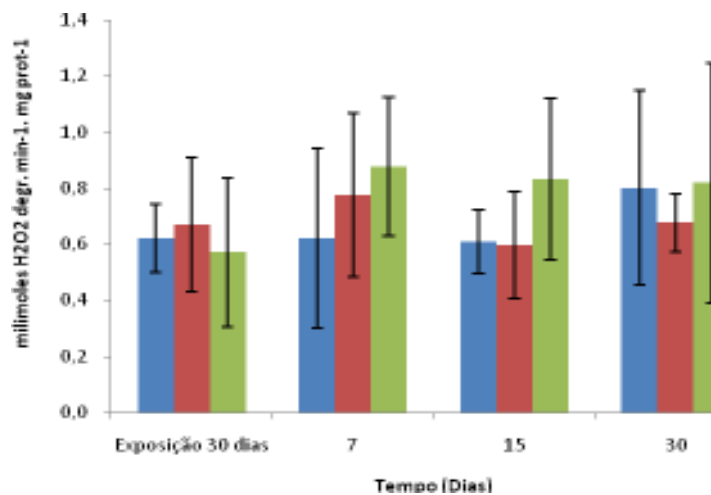


Figura 24 - Atividade específica da catalase em fígado de tilápias, *O. Niloticus*, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre no ensaio II. ■ controle ■ 0,5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

Em peixes, as enzimas antioxidantes podem ser inibidas ou induzidas pelo cobre de acordo com a dose, espécie e rota de exposição (SANCHEZ *et al.*, 2005). *Dando rio* submetido a 40 e 140µg /L de

cobre na forma de sulfato de cobre dissolvido na água apresentou indução da CAT e GST após duas semanas de exposição (PARIS-PALACIOS *et al.*, 2000). Ao contrário, em carpas, CAT e GST foram inibidas após 96 h de exposição a 100 e 250 μgL^{-1} de cobre na forma de sulfato de cobre (DAUTREMEPUITS *et al.*, 2002). VIJAYAVEL *et al.* (2006), encontraram diminuição da atividade da catalase para o peixe *Terapon jarbua* exposto à concentrações de 1,0 mg.L^{-1} de cobre. Por outro lado, ROMEO *et al.* (2000), não encontraram qualquer alteração na atividade da CAT em células de rim expostas ao cobre, assim como no presente estudo, onde o cobre não alterou a atividade dessa enzima.

A toxicidade de um metal pode ser vista através da peroxidação lipídica, considerada como o primeiro passo para danos na membrana celular causados por xenobióticos (VIARENGO *et al.*, 1989). O cobre, por sua vez, possui a capacidade de oxidar lipídios de membrana em peixes (PEDRAJAS *et al.*, 1995), o que ocasionaria o processo de peroxidação lipídica. Entretanto, no presente trabalho os resultados de peroxidação lipídica (LPO) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos para os dois ensaios (Figuras 25 e 26).

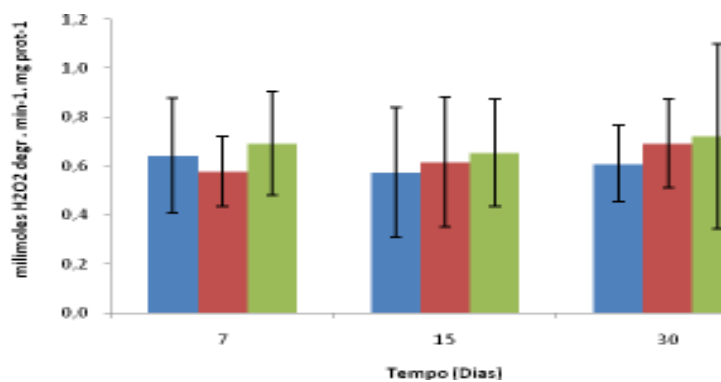


Figura 25 - Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos em fígado de tilápias, *O. niloticus*, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre nos diferentes momentos de coleta.

■ controle ■ 0,5 mg.L^{-1} ■ 2,0 mg.L^{-1}

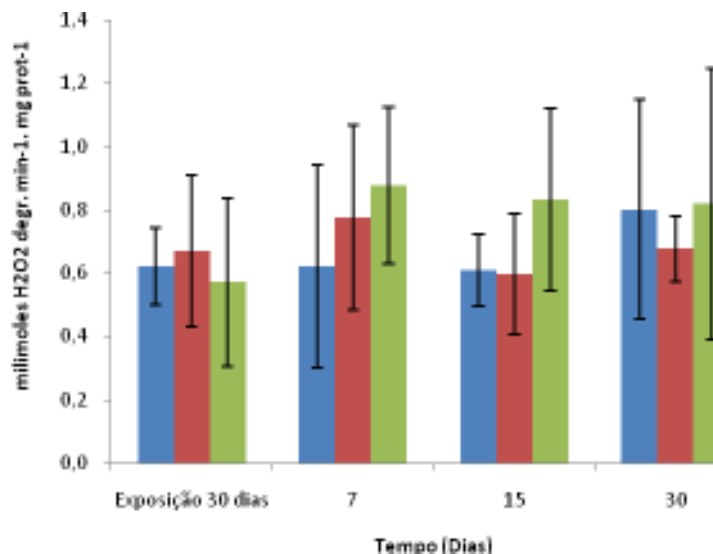


Figura 26 - Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos em fígado da tilápias, *O. niloticus*, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre, aos 30 dias de exposição e nos diferentes momentos de coleta da depuração ■ controle ■ 0.5 mg.L⁻¹ ■ 2,0 mg.L⁻¹

5.6 Análises Histopatológicas

5.6.1 Brânquias

A tilápia possui quatro arcos branquiais, situados de cada lado da cavidade bucal. Cada arco branquial tem uma estrutura cartilaginosa e possui um fileira dupla de lamelas branquiais primárias achatadas dorso-ventralmente. Essas lamelas subdividem-se em lamelas branquiais secundárias, que se encontram dispostas perpendicularmente. As lamelas branquiais possuem um epitélio estratificado, constituído por diversos tipos de células, entre os quais destacam-se as células de cloro, mucosas e pavimentosas (Figura 27) (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007).

O epitélio assenta-se sobre o seio venoso central e encontra-se segmentado por eixos vasculares que originam as lamelas secundárias. Essas estruturas representam projeções teciduais acima da superfície externa do epitélio lamelar. Desse modo, as lamelas são constituídas centralmente por um eixo vascular

e por um epitélio composto por células pavimentosas de revestimento e indiferenciadas. Esse epitélio assenta-se na lâmina basal de células endoteliais modificadas (células pilar) que suportam e delimitam o compartimento sanguíneo celular (Figura 29) (GARCIA-SANTOS, *et al.* 2007).

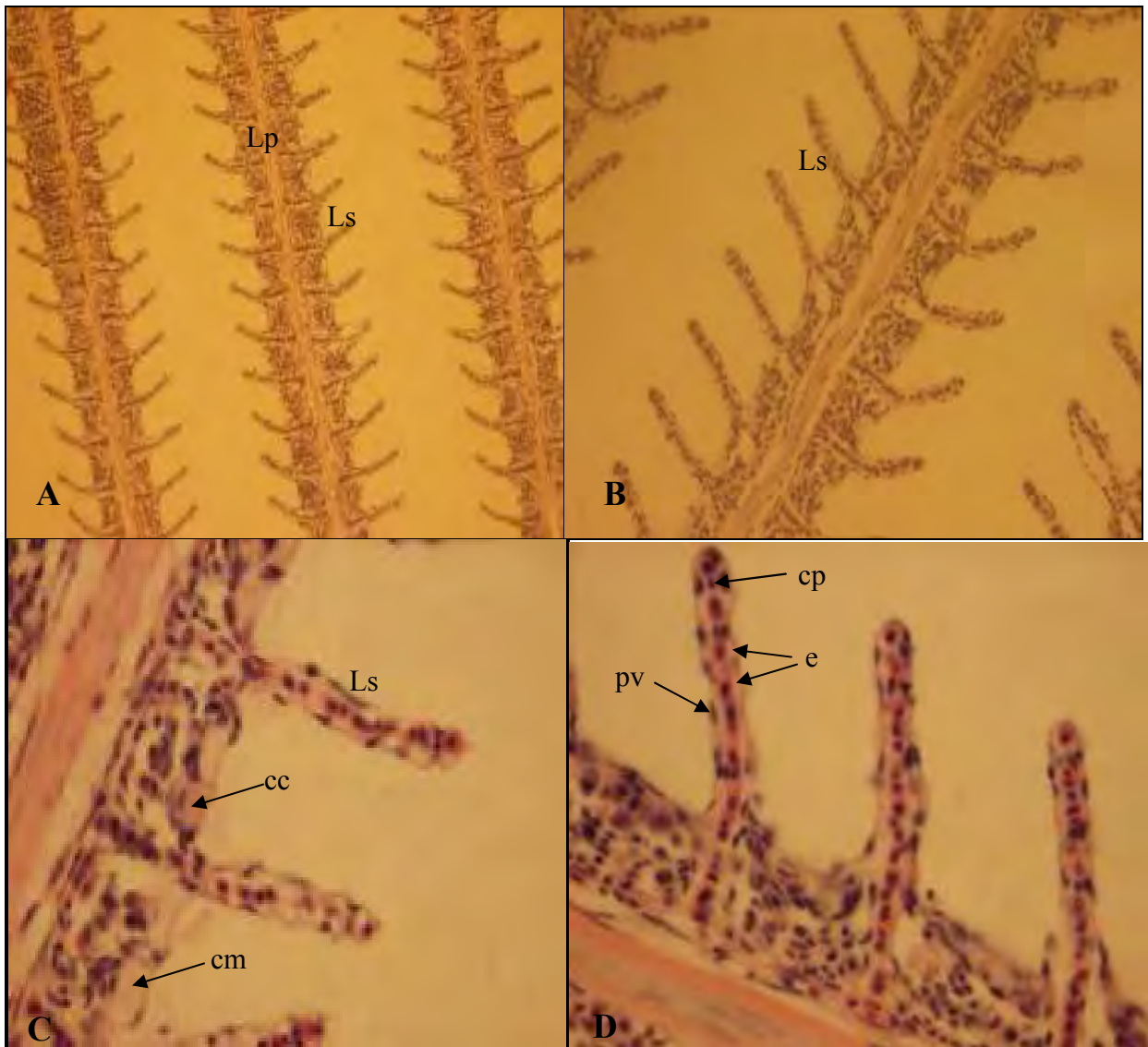


Figura 27 - Brânquias de tilápias do grupo controle. (A) Lp=lâmina primária, aumento de 200X. (B) Ls=lâmina secundária, aumento de 400X. (C) cc= célula de cloro; cm= célula mucosa, aumento de 100X. (D) pv= célula pavimentosa; cp= célula pilar; e= eritrócitos, aumento de 100ox. Microscopia ótica, HE

Nos organismos aquáticos as brânquias são um órgão vital, uma vez que possuem papel importante no transporte de gases respiratórios e regulação do balanço osmótico e iônico. Substâncias tóxicas podem causar danos aos peixes, causando redução do consumo de oxigênio e interrupção na osmoregulação nas brânquias (GHATE e MULHERKAR, 1979).

No ensaio I os peixes expostos ao cobre nas duas concentrações testadas (0,5 e 2,0 mg.L⁻¹) apresentaram alterações nas brânquias já a partir do sétimo dia de coleta. Com aumento do epitélio interlamelar da lamela primária e fusão das lamelas secundárias quando comparados com o controle (Figura 28). Além disso, foi registrado também edema subepitelial. No experimento II, as lesões histopatológicas aos 30 dias de exposição foram às mesmas registradas no experimento I (Figura 29). No período de recuperação a análise histológica das brânquias mostrou que as lesões persistiram, ou seja, não houve recuperação dos animais.

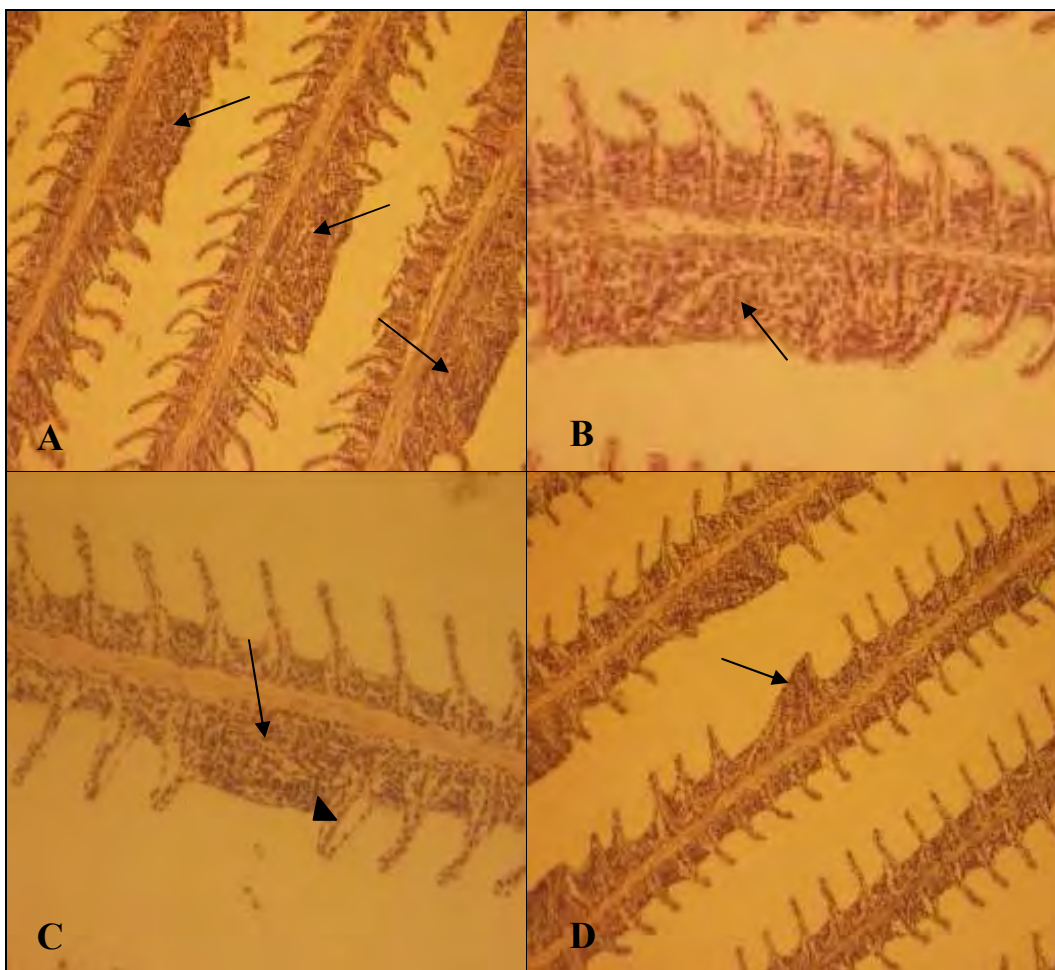


Figura 28 –Fotomicrografia de brânquias de tilápia. Em A) Aumento de epitélio interlamelar (seta). Tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ no ensaio I 200X. HE. Em B) Aumento de epitélio interlamelar (seta). Tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ no ensaio I 400X. HE. Em C) Aumento de epitélio interlamelar (seta); edema subepitelial (cabeça de seta). Tratamento com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ no ensaio II 400X. HE. Em D) Fusão de lamelas secundárias (seta). Tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ no ensaio II 200X.

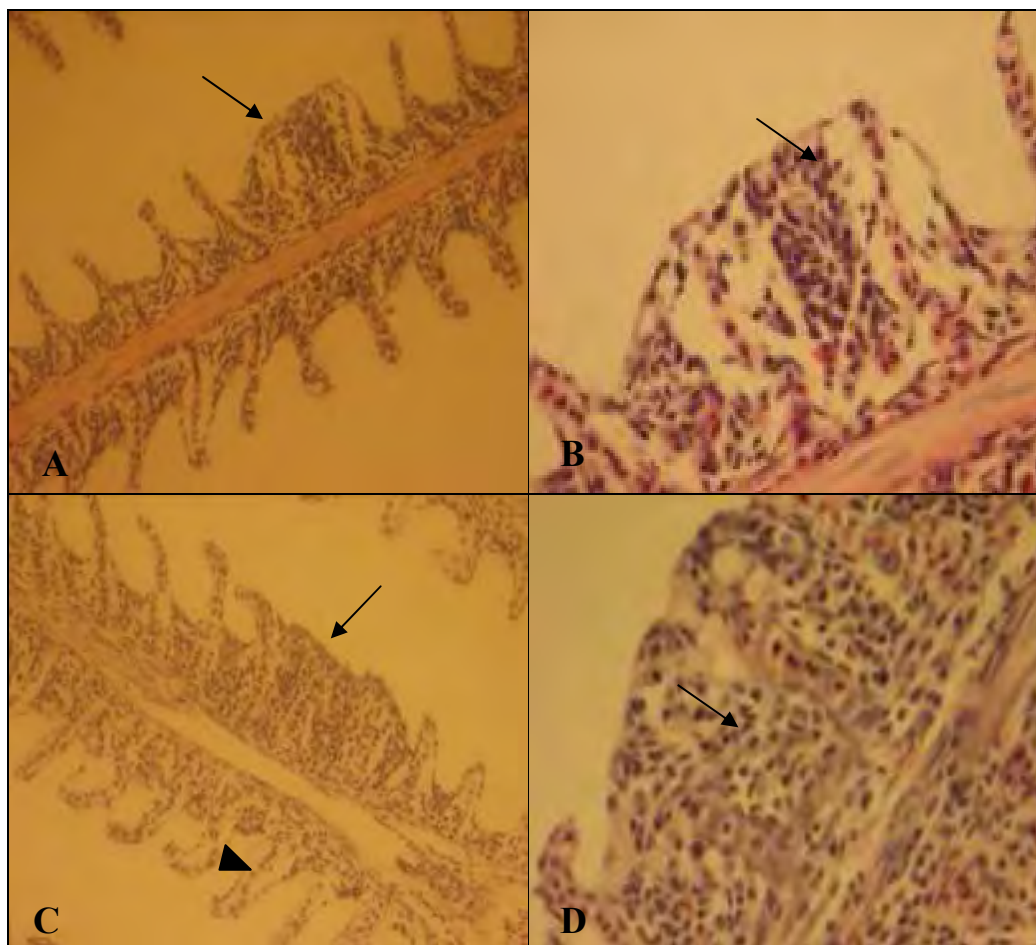


Figura 29 - Fotomicrografia de brânquias de tilápia. Em A) Aumento de epitélio interlamelar (seta). Tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio I 400X. HE. Em B) Aumento de epitélio interlamelar (seta). Tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio I 1000X. HE. Em C) Aumento de epitélio interlamelar (seta). Edema subepitelial (cabeça de seta). Tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio II 400X. HE. Em D) Fusão de lamelas secundárias (seta). Tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio II 200X.

Alterações morfológicas nas brânquias de peixes expostos a concentrações agudas e subagudas de cobre têm sido extensivamente estudadas (GUPTA e RAJBANSHI, 1981; ROJIK *et al.*, 1983; DAOUST *et al.*, 1984; LAUREM e McDONALD 1985; EBELE *et al.*, 1990; KHANGAROT e TRIPATHI, 1991; PELGROM *et al.*, 1995; KARAN *et al.*, 1998). O edema subepitelial, segundo MALLAT (1985) é uma das principais alterações estruturais das brânquias causadas devido á exposição

á metais pesados. De acordo com THOPHON ET AL. (2003), o edema é um dos primeiros sinais de patologia em peixes

As mesmas lesões nas brânquias registradas no presente estudo, ou seja, hiperplasia do epitélio interlamelar foi encontrada em *O. niloticus* expostas ao cobre (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2007), em *Prochilodus scrofa* expostos ao sulfato de cobre, em *Oreochromis niloticus* expostas ao cadmio (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007) e também em truta arco-íris expostas ao cromo (ALAZEMI *et al.*, 1996). Segundo OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (2000), mudanças em brânquias como as descritas acima são fortemente associadas à exposição de metais. Em geral alterações histopatológicas em brânquias, são respostas não específicas à exposição a poluentes (MALLAT, 1985). Alguns íons metálicos possuem alta afinidade com ligantes intracelulares (WEBB, 1979). A toxicidade desses metais nas brânquias de peixes pode ser atribuída a perda de capacidade oxidativa das brânquias através do rompimento da organização celular (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2000).

O cobre pode levar ao aparecimento de hiperplasia, um típico mecanismo de defesa que age como uma barreira para a difusão de contaminantes, resultando em diminuição do espaço interlamelar das lamelas secundárias (RANDI *et al.*, 1996). Entretanto, o espessamento do epitélio filamentar leva também ao aumento da distância de difusão água-sangue, dificultando as trocas gasosas. (KARAN *et al.*, 1998). Além disso, esse dano pode ser devido à proliferação de células cloreto e de células indiferenciadas (DANG *et al.*, 1999). PELGRON *et al.* (1995) relataram aumento no número de células de cloreto, assim como, no diâmetro das mesmas, em peixes expostos ao cobre. Hiperplasia de células cloreto pode ser resultado de um mecanismo compensatório em resposta ao estresse osmótico (RANDI *et al.*, 1996). O cobre poderia inibir o carreamento de íons por células cloreto provocando um aumento no número de suas células, numa tentativa de compensar o déficit osmótico (RANDI *et al.*, 1996).

A fusão de lamelas, lesão encontrada neste estudo, causa uma diminuição na área respiratória total das brânquias, resultando em um decréscimo na entrada de oxigênio através das brânquias, resultando em uma situação de hipóxia (NOWAK, 1992). De acordo com ALAZEMI *et al.* (1996) a diminuição da capacidade de difusão das brânquias, assim como a diminuição do espaço entre lamelas secundárias vizinhas foi atribuída ao aumento no volume da lamela secundária causada pela exposição a metais pesados.

Neste trabalho após terem sido retirados da condição de exposição ao cobre, as lesões observadas após 30 dias de recuperação permaneceram e estes resultados foram similares aos encontrados por KARAN *et al.* (1998), onde carpas apresentaram as mesmas lesões após 14 dias em água sem cobre.

5.6.2 *Fígado*

Não ocorreu diferença entre os animais do grupo controle e os animais expostos as duas concentrações de cobre nos dois ensaios, com relação a alterações no tecido hepático. Em todos os grupos, os animais apresentaram áreas de necrose, em muitos casos preenchidos por tecido conjuntivo, formando uma cicatriz. Como essa mudança no tecido foi encontrada no grupo controle, não podemos atribuir tal dano à exposição ao cobre.

5.6.3 *Pâncreas*

O pâncreas na maioria dos peixes teleósteos é difuso e consiste em pequenos glóbulos de tecido pancreático espalhado pelo mesentério do peixe (principalmente entre as células adiposas dos cecos pilóricos, no revestimento subcapsular do baço e na capa externa que rodeia a veia porta hepática), cada um provido por uma artéria, veia, nervo e ducto pancreático. Nas espécies em que o fígado e o pâncreas estão combinados, este tecido se estende ao redor do ramo principal da veia porta, formando uma espécie de glândula externa. O tecido pancreático, em algumas espécies, encontra-se difuso no fígado,

sendo chamado de pâncreas intra-hepático ou hepatopâncreas. Geralmente, os ductos se unem com o ducto da bile para formar um ducto biliar comum antes de entrar na parte superior do intestino, embora algumas espécies possuam ductos independentes (ROTA, 2003)

A estrutura do pâncreas dos peixes é bastante semelhante à dos mamíferos (ROTA, 2003). Em mamíferos a maior parte do pâncreas é constituído de ácinos, que são as unidades secretoras exócrinas do pâncreas, classificadas como epitélio glandular exócrino acinar seroso. Os ácinos do pâncreas são formados por células que são parte basófila e parte acidófila. A porção apical da célula é acidófila e contém grânulos de zimogêneo (precursor inativo de enzimas), que serão posteriormente secretados pela célula. A parte basal é basófila devido à grande quantidade de ribossomos ligados ao retículo endoplasmático (ergastoplasma), que fazem a produção protéica da célula, que será depois secretada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). De acordo com DIAZ *et al.* (1999) em peixes teleósteos, a porção exócrina do pâncreas, se apresenta na forma de glândula acinosa composta, formado por cordões de células cilíndricas com núcleo basal. O pâncreas observado no presente estudo seguiu a descrição feita acima (figura 30).

No presente estudo foram registradas alterações no pâncreas, quando comparado ao grupo controle nos dois ensaios e nas duas concentrações testada, sendo, que no ensaio I as lesões foram aparentes a partir do sétimo dia de exposição (Figura 31). Essas alterações apresentaram-se como desorganização na estrutura do tecido do pâncreas ou diferenciação tecidual. As lesões observadas no ensaio II diminuíram no período de recuperação, já a partir do sétimo dia de exposição (Figura 33). O hepatopâncreas de peixes freqüentemente apresenta alteração quando exposto a poluentes aquáticos (HENAREZ *et al.*, 2007, 2008).

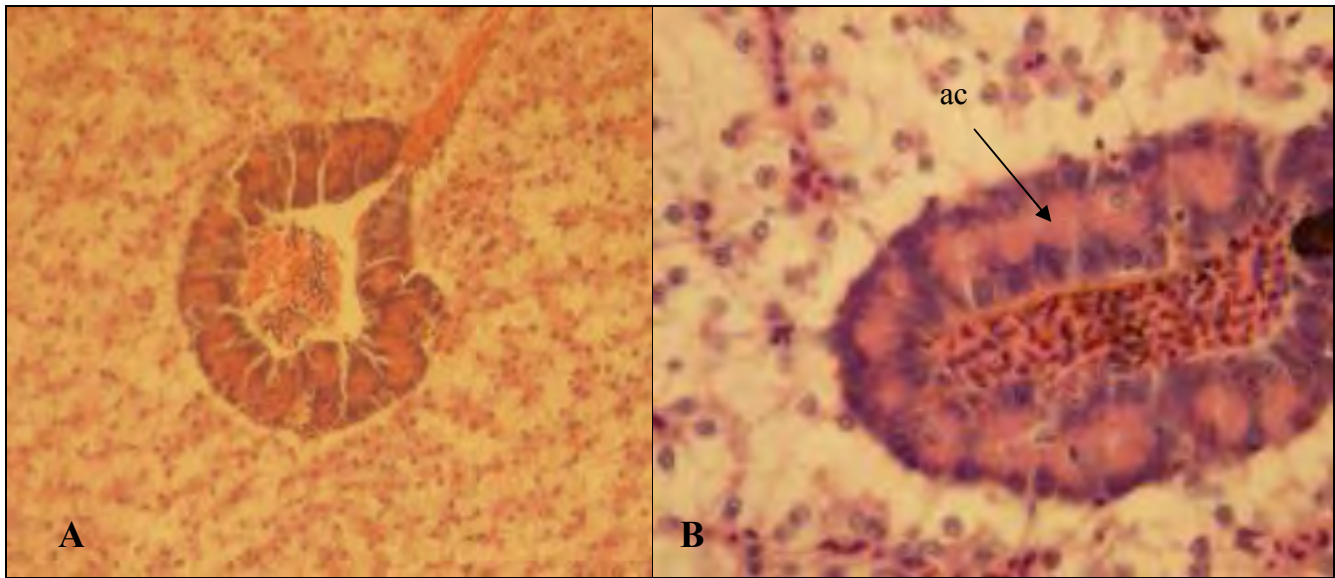


Figura 30 - Hepatopâncreas de tilápias do grupo controle (A), aumento de 400X. Hepatopâncreas de tilápias do grupo controle (B), ac= acinos pancreáticos, aumento de 1000X. HE

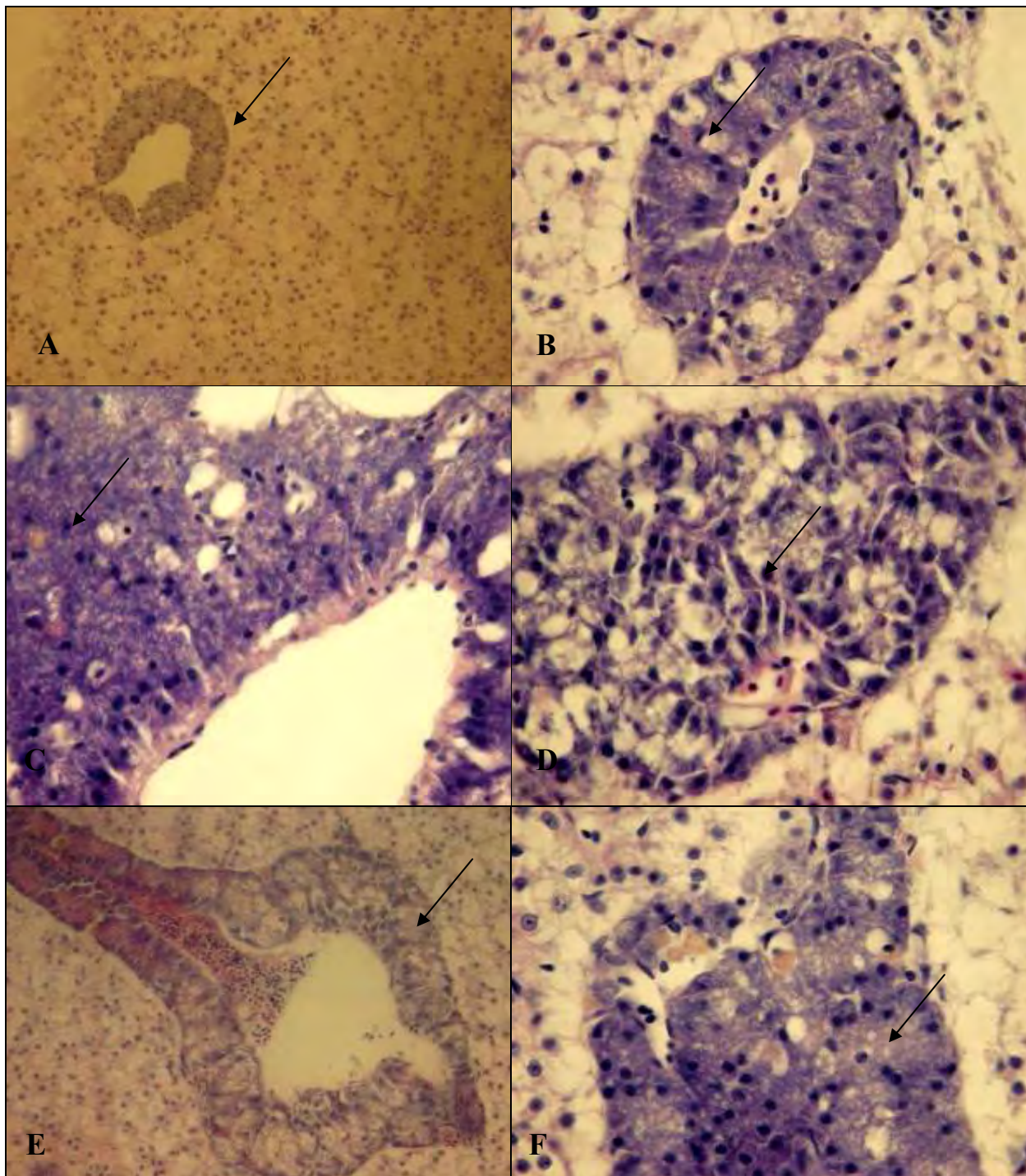


Figura 31 – Fotomicrografia de Hepatopâncreas de tilápia. Em A) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio I. 200X. Em B) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio I. 1000X. Em C) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio II. 1000X. Em D) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio II. 200X. Em E) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no ensaio I. 400X. Em F) Desarranjo celular do hepatopâncreas (seta). Tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ensaio II (D). 1000X. HE

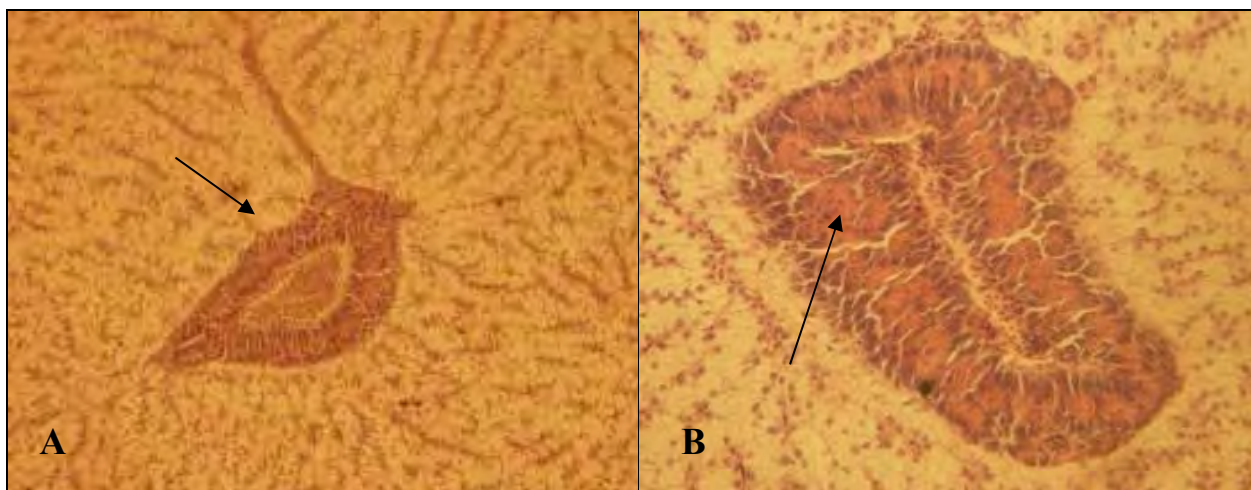


Figura 32 - Fotomicrografia de Hepatopâncreas de tilápia. Hepatopâncreas exposto à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato de cobre após recuperação de 7 dias (A) 200X. Hepatopâncreas após exposto à $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato de cobre após recuperação de (B). HE, aumento de 400X.

5.7. Ensaio Ecotoxicológicos

5.7.1 *Pseudokirchneriella subcapitata*

O crescimento algáceo obtido nos ensaios com as diluições a partir da concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ podem ser observados na Figura 33. Ocorreu diferença estatística entre o controle e todas as diluições, ou seja, o sulfato de cobre mesmo na menor concentração, 3,1% ($0,062 \text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4), causou inibição no crescimento das algas. Essa concentração corresponde, portanto, à concentração de efeito observado (CEO) e significa dizer que mesmo a maior diluição, de acordo com o presente estudo não foi suficiente para diminuir a toxicidade do cobre para a alga *P.subcaptata*.

De acordo com FARBER *et al.* (1997) o CE50 refere-se à inibição de crescimento algáceo em ensaios ecotoxicológicos e são excelentes descritores de impacto que compostos tóxicos podem ter numa população algácea. No presente trabalho a EC50 foi $0,054 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ CuSO_4 . Este valor ficou próximo ao encontrado por MURRAY-GULDE *et al.* (2002) para a mesma espécie que foi $0,042 \text{ mg.L}^{-1}$ CuSO_4 . BOSSUYT e JANSSEN (2004) encontraram valor de EC50 de $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre. ARUOJA *et al.* (2009) encontraram valor de EC50 de $0,020 \text{ mg.L}^{-1}$ pra o CuSO_4 . Por outro lado, RODRIGUEZ *et*

al. (2003) encontraram valores de $0,164 \text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 em ensaios com a mesma espécie. Diversos trabalhos relatam valores de EC_{50} que variam de $0,008$ a $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre (BARTLET *et al.*, 1974; CHRISTENSEN *et al.*, 1979; BLAYLOCK *et al.*, 1985; HALEY *et al.*, 1986; FRANKLIN *et al.*, 2001, 2002). Estes autores sugerem que essa variação é devido a diferenças no cultivo e composição do meio de teste que afetam o desempenho algal e biodisponibilidade do metal.

De acordo com os resultados, é possível notar que a diminuição na taxa de crescimento apresentou um padrão concentração-dependente, principalmente a partir da diluição 12,5%. Nota-se que quanto maior a concentração de cobre menor a taxa de crescimento da alga *P. subcaptata* (Figura 35). O mesmo padrão de resposta concentração-dependente foi encontrado por BOSSUYT e JANSSEN (2004) e RODRIGUES *et al.* (2003) para *P. subcaptata* e por LEVY *et al.* (2007) para diferentes microalgas marinhas expostas ao cobre.

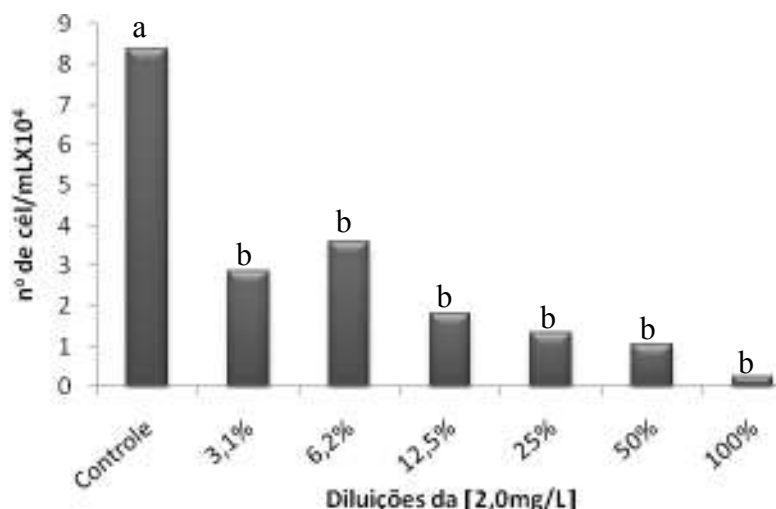


Figura 33 - Taxa de crescimento da alga *P. subcaptata* exposta a diferentes diluições da concentração $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 por 72 horas. Média de três ensaios.

A toxicidade do cobre para as algas *P. subcaptata* em concentrações abaixo do menor valor recomendado para seu uso como parasiticida, que é de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 , (PAVANELLI *et al.*, 2002)

mostra que a aplicação desse produto nos tanques de criação de organismos aquáticos como peixes pode atingir espécies não alvo, como o fitoplâncton, o zooplâncton e até mesmo os peixes comprometendo a saúde dos animais e conseqüentemente a própria produção.

O fato do cobre ter diminuído o crescimento das algas na maior diluição a partir da concentração $2,0\text{mg.L}^{-1}$ mostra o risco ambiental que o uso do sulfato de cobre apresenta, uma vez que o dano causado por ele em uma espécie que é produtora primária pode significar o comprometimento de toda a cadeia alimentar influenciando outros níveis tróficos. Além disso, este resultado pode significar que mesmo que o efluente seja diluído antes de ser lançado no corpo da água receptor não seria suficiente para minimizar os danos ao ambiente aquático. De acordo com MAXIMIANO *et al.* (2005), além de altos teores de matéria orgânica, os efluentes de piscicultura podem conter substâncias químicas, prejudiciais à saúde humana e ao ambiente, que são utilizadas para controle de patógenos e parasitas. Além disso, a presença de cobre em ambientes naturais poderia mudar uma comunidade alterando a diversidade e abundância, uma vez que as espécies apresentam sensibilidade diferente, como mostrado por LEVY *et al.* (2007)

No ambiente natural sabe-se que somente uma parte do cobre é disponível para a biota aquática. A biodisponibilidade do cobre é influenciada no sistema aquático pela complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, adsorção a óxidos metálicos, argila e material particulado em suspensão, bioacumulação e troca entre sedimento e água (WHO, 1998). Apesar de nem todo o cobre lançado estar biodisponível deve haver maior cuidado com o uso desse químico, a fim de se evitar o comprometimento do ambiente aquático.

5.7.2 *Ceriodaphnia dubia*

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *C. dubia* mostram toxicidade aguda para todas as diluições a partir da concentração $2,0\text{mg.L}^{-1}$ CuSO_4 . Foi observado mortalidade total (10 indivíduos) dos animais expostos ao cobre. Além disso, a partir da concentração 6,2 a mortalidade de todos os indivíduos aconteceu com apenas 24 horas de exposição, somente para a maior diluição (3,1%) um animal dos 10 colocados nos recipientes permaneceu vivo por 48 e 72 horas nos Ensaio II e III, respectivamente. Por outro lado, no grupo controle, houve uma pequena mortalidade nos Ensaio I e II, registrada no sétimo dia, entretanto, essa mortalidade ficou dentro do permitido para testes de toxicidade com *C. dubia*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o sulfato de cobre foi altamente tóxico para a espécie avaliada, uma vez que houve mortalidade para todos os organismos expostos ao agente químico, e essa situação é agravada pelo fato da mortalidade ter sido registrada com apenas 24 horas de exposição. De acordo com SCHWARTZ e VIGNEAULT (2007), *C. dubia* é uma das espécies de água doce mais sensíveis ao cobre. E medidas de risco ambiental requerem o conhecimento da toxicidade em diferentes níveis tróficos (RADIX *et al.*, 2000). Com base nessas duas colocações podemos dizer que *C. dubia* é um excelente modelo em estudos ambientais onde se pretende avaliar a presença e o efeito do cobre em organismos aquáticos.

As concentrações de cobre usadas neste trabalho foram aquelas descritas para uso de sulfato de cobre como parasiticida e algicida, principalmente na sua aplicação em criações de peixe. O teste com *C. dubia* foi feito com concentrações de -3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100%-da concentração $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 , que correspondem a concentrações de 0,062; 0,124; 0,25; 0,5; 1,0; e $2,0\text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 , respectivamente. O fato do cobre mesmo em concentrações abaixo das recomendadas para seu uso como algicida e parasiticida ter causado toxicidade aguda, matando 100% dos organismos expostos, significa

que quando aplicado em um tanque de cultivo, por exemplo, poderá atingir espécies não alvo como o zooplâncton, comprometendo o equilíbrio ecológico do viveiro, uma vez que esses organismos são importantes para a dinâmica do cultivo.

O efluente de uma piscicultura é na maioria das vezes lançado no ambiente natural com altas concentrações de substâncias químicas, incluindo o cobre. Uma vez no ecossistema aquático esse metal poderá alterar a comunidade zooplânctônica, eliminando espécies mais sensíveis e favorecendo outras mais resistentes, alterando a diversidade e abundância da comunidade (MOUNT e NORBERG, 1984). KOIVISTO *et al.* (1992) demonstraram que diferentes espécies de cladóceros, podem exibir diferenças consideráveis na sensibilidade ao cobre. BOSSUYT e JANSSEN (2004) também demonstraram diferenças interespecíficas entre cladóceros coletados em ambiente natural e expostos ao cobre. De acordo com GUSMÃO (2004), em um experimento com a exposição de diversas espécies de cladóceros ao cobre, a diversidade foi reduzida, e das cinco espécies que estavam presentes no início do experimento, somente *Ceriodaphnia silvestrii* foi observada ao final. Em geral, em resposta a um estresse químico espécies do macrozooplâncton (*Daphnias* sp, por exemplo), frequentemente são extintas, permitindo que o microzooplâncton (por exemplo, pequenas espécies de cladóceros e rotíferos) possa se tornar dominante em ecossistemas sob estresse, isto acontece porque em geral, as espécies do macrozooplâncton são mais sensíveis ao estresse químico do que o microzooplâncton (XU *et al.*, 2001).

Segundo ODUM (1985), uma perturbação desorganizadora (a contaminação por metais, por exemplo) para a qual a comunidade não esta adaptada interrompe e, em muitos casos reverte o desenvolvimento autogênico. Sendo assim, o autor descreveu uma série de tendências que podem ser esperadas em um ecossistema sob estresse, entre elas, alterações da estrutura zooplânctônica.

Outro fator observado é que no presente estudo mesmo a maior diluição não foi eficaz na redução da toxicidade do sulfato de cobre. Assim, infere-se que o efluente deixaria de exercer efeito

tóxico à comunidade zooplanctônica do corpo hídrico receptor, somente a partir do momento em que a concentração de sulfato de cobre, neste efluente, fosse naturalmente diluída a valores inferiores a 3,1%. Isto significa dizer que a pluma de dissipação do efeito tóxico do cobre no ambiente poderá ser bastante extensa, pois as concentrações seguras para as comunidades não alvo somente serão estabelecidas, quando o corpo receptor tiver agregado grandes volumes de água, provenientes de seus afluentes.

A toxicidade do cobre no ambiente aquático pode ser aumentada ou diminuída de acordo com as características físicas e químicas da água. O efeito tóxico do cobre, por exemplo, pode ser reduzido pela presença de agentes quelantes (De FILIPPIS e PALLAGHY, 1994). Isso quer dizer que no ambiente natural a toxicidade do cobre para espécies zooplanctônicas pode ser menor que a observada no presente estudo, realizado em laboratório. Por outro lado, as comunidades aquáticas são limitadas por fatores como substâncias tóxicas (LAMPERT e SOMMER, 1997). Ainda de acordo com MARGALEF (1983) a comunidade biológica é um reflexo da integração das variáveis que atuam no ecossistema como um todo. Diante de tais afirmações e dos resultados do presente estudo, onde o sulfato de cobre causou toxicidade aguda para a espécie *C. dubia*, o uso desse químico em tanques de piscicultura ou em reservatórios deve ser visto com cautela, mesmo que no ambiente natural, diversos fatores possam alterar a sua toxicidade.

6. CONCLUSÕES

As observações do presente estudo mostram que é necessária cautela no uso de sulfato de cobre na aquicultura uma vez que esse químico causou toxicidade crônica nos peixes e toxicidade aguda para os microcrustáceos e algas.

O uso de sulfato de cobre na aquicultura nas concentrações testadas neste estudo provocou danos à saúde dos peixes. Além disso, o efluente lançado no ambiente natural pode comprometer o ecossistema. Do ponto de vista ecotoxicológico não é recomendado o uso desse produto na aquicultura

Altos valores de concentração de cobre foram registrados nas brânquias e principalmente no fígado durante a exposição e permaneceu alto na recuperação, provavelmente devido à mobilização do metal de outros órgãos para o fígado onde é realizada a sua excreção.

Não ocorreu acúmulo de cobre no músculo dos animais expostos ao sulfato de cobre.

O cobre causou alterações no sistema imunológico dos peixes, o que foi observado através da diminuição da capacidade fagocítica.

O cobre causou alterações bioquímicas nos animais durante exposição e recuperação. A diminuição nos valores de GSH indica essa alteração. A presença de cobre no fígado dos animais, durante a recuperação, foi responsável pela mudança nos valores de GSH nesse período.

O cobre causou alterações histopatológicas observadas através de lesões nas brânquias e hepatopâncreas dos peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. 2005a. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12648: Ecotoxicologia Aquática-Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). São Paulo. 24 p.
- ABNT, 2005b. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustácea, Cladocera), Rio de Janeiro.
- ADAMS, S.M. e GREELEY, M.S. 1999. Establishing possible links between aquatic ecosystem health and human health: an integrated approach. In: GIULIO, D.I. e MONOSSON, R.T. (eds.). Interconnections between human and ecosystem health, London: Chapman and Hall, pp 91-102.
- ADEMA, D.M.M., KUIPER, J., HANSTVEIT, A.O., e CANTON, J.H., 1982. Consecutive system of tests for assessment of the effects of chemical agents in the aquatic environment. PB83-167114. National Technical Information Service, Springfield, VA, pp. 1e14.
- ADHAM, K.G., HASSAN, I.F., TAHA, N. e AMIN, T.H. 1999. Impact of hazardous exposure to metals in the Nile and Delta lakes on the catfish, *Clarias lazera*. *Environ. Monit. Assess.* 54: 107–124.
- AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*105: 121-126.
- AHLF, W. e HEISE, S. 2005. Sediment toxicity assessment: rationale for effect classes. *J. Soil Sed.*, 5:16–20.
- ALAZEMI, B.M., LEWIS, J.W. e ANDREWS, E.B. 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family; Mormyridae) exposed to selected pollutants: An ultrastructural study. *Environ. Technol.* 17: 227-238.
- ALKAHEN, H.F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *J. Uni. Kwait, Khaldlya.* 21, 243-252.
- ALMAR, M., OTERO, L., SANTOS, C., GONZALEZ-GALLEGO, J. 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health B33.6:* 769-783.
- ANDERSON, S.R., DIXON, O W., BODAMMER, J.E. e LIZZIO, E.F. 1989. Suppression of antibody producing cells in rainbow trout spleen section exposed to copper in vitro. *J. Anim. Health.* 1: 557-561.
- APHA; AWWA; WPCF. 2005. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, Washington, D.C: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation, 1085 p.
- ARAGÃO, M.A. e ARAÚJO, R.P.A. 2008. Métodos de ensaio de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E (Eds). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações, São Carlos: Rima, pp. 117-147.

- ARANA, C.V. 1999. Aqüicultura e desenvolvimento sustentável: subsidio para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira. Florianópolis, editora da UFSC, 310p.
- ARIAS, A.R.L., BUSS, D.F., ALBURQUERQUE, C., INÁCIO, A.F., FREIRE, M.M., EGLER, M., MUGNAI, R. e BAPTISTA, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12: 61-72.
- ARUOJA, V., DUBOURGUIER, H.C., KASEMETS, K. e KAHRU, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of Total Environment*. 407: 1461-1468.
- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASES REGISTRY). 1990. Toxicological profile for cooper. Syracuse: US Department of Commerce,
- AU, D.W.T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48: 817–834.
- AU, D.W.T., WU, R.S.S., ZHOU, B.S. e LAM, P.K.S. 1999. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to benzo[a] pyrene. *Environmental pollution*. 104: 235-247.
- BAKER, J.T. 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder. *Journal of the fish. Res. Board. Can.* 26: 2785-2793.
- BAKER, J.T. e KNITTEL, M.D. 1983. Susceptibility of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, and rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to infection with *Vibrio anguillarum* following copper exposure. *J. Fish. Dis.* 6: 267-275.
- BALIRWA, J.S. 1992. The evolution of the fishery of *Oreochromis niloticus* (pisces: Cichlidae) in lake Victoria. *Hydrobiologia* 232: 85–89.
- BALLATORI, N.E. e BOYER, J.L. 1986. Slow biliary elimination of methyl mercury in the marine elasmobranches, *Raja erinacea* and *Squalus acanthias*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85: 407–415.
- BARRIGA-SOSA, I.D.L.A., JIMÉNEZ-BADILLO, M.D.L., IBÁÑEZ, A.L. e ARREDONDO-FIGUEROA, J.L., 2004. Variability of tilapias (*Oreochromis* spp.) introduced in Mexico: morphometric, meristic and genetic characters. *J. Appl. Ichthyol.* 20: 7–14.
- BARTLETT, L., RABE, F.W. e FUNK, W.H. 1974. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 8:179–185.
- BAUDO, R., 1987. Ecotoxicological testing with Daphnia. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 45: 461-482.
- BENDELL-YOUNG, L.I., HARVEY, H.H. e YOUNG, J.F. 1986. Accumulation of cadmium by white sucker, *Catastomus commersoni* in relation to fish growth and lake acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 43: 806–811.

- BENGSTON, B. e LARSSON, A. 1986. Vertebral deformities and physiological effects in fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) after long-term exposure to a simulated heavy metals containing effluent. *Aquat. Toxicol.* 9: 215-229.
- BENNANI, N., SCHIMID-ALLIANA, A. e LAFAURIE, M. 1995. Evaluation of phagocytic activity in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 237-246
- BERNARD, E.J.J., PRESSINOTTI, L.N., BORGES, J.C.S. e SILVA, J.R.M.C. 2002. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (steindachner, 1881). *Aquaculture* 251: 509-515.
- BERVOETS, L., CAMPENHOUT, K.V., REYNDERS, H., KNAPEN, D.A, COVACI, A. e BLUST, R. 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 720-728.
- BILIARD, R., BRY, C. e GILLET, C. 1981. Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: A.D., PICKERING (ed). *Stress and fishes*, London, Academic Press, pp 185-207.
- BLAYLOCK, B.G., FRANK, M.L. e MCCARTHY, J.F. 1985. Comparative toxicity of copper and acridine to fish, *Daphnia* and algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 4: 63-71.
- BLINOVA, I. 2000. The perspective of microbiotests application to surface water monitoring and effluent control in Estonia. *Environ. Toxicol.* 15: 385-389.
- BLINOVA, I. 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ Toxicol.* 19: 425-8.
- BOLS, N.C., BRUBACHER, J.L., GANASSIN R.C. e LEE, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 853-873.
- BOOCK, M.V. e MACHADO NETO, J.G. 2000. Estudos toxicológicos do oxiclóreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). *Arq. Inst. Biol.* 67:215-221.
- BOSSUYT, B.T.A. e JANSSEN, C.R. 2004, Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology* 60: 61-74.
- BOUDOU, A., DELARCHE, A., RIBEYRE, F. e MARTY, R. 1979. Bioaccumulation and bioamplification of mercury compounds in a second level consumer, *Gambusia affinis* temperature effects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 813-818.
- BOYD, C.E., 1982. *Water quality management for pond fish culture*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company. 318p.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRASIL. 1998. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis

máximos de contaminantes químicos em alimentos. Diário Oficial, Brasília, DF, de 24 de setembro de 1998

- BURATINI, S.V. e BRANDELLI, A. 2008. Bioacumulação. In: ZAGATO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds). Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima, pp. 55-88.
- CANESI, L., VIARENGO, A., LEONZIO, C., FILIPPELLI, M. e GALLO, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46: 67-76
- CARPENÈ, E. e VASÁK, M. 1989. Hepatic metallothionein form goldfish (*Carassius auratus* L.). *Com. Biochem. Physiol B* 92: 463-468
- CASSILAS, E. e SMITH, L.S. 1977. Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* 10: 481-491.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1991. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Vol. I. Testes crônicos com *Ceriodaphnia*. São Paulo. 28p. + anexos.
- CETESB. (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1997. Manual de Orientação em casos de Florações de Algas tóxicas: um problema ambiental e de saúde pública.
- CETESB. (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2002. Métodos de Avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos, São Paulo.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2005. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>. Acesso em 24/01/06
- CHRISTENSEN, E.R., SCHERFIG, J. e DIXON, P.S. 1979. Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*. *Water Res.* 13: 79-92.
- CLEARWATER, S.J., FARAG, A.M. e MEYER, J.S. 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132: 269-313.
- ÇOĞUN, H.Y. e KARGIN, F. 2004. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* 55: 277-282
- COHEN M.V., 1989. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injuries is this time for clinical trials? *Ann. Intern. Med.* 111: 918-931.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, 23p.
- DAMATO, M. 2000. Workshop sobre Qualidade da Água na Aqüicultura. Anais-Pirassunga: CEPTA, 92 p
- DAMERON, C.T. e HARRISON, M.D. 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.S* 67: 1091-1097.

- DANG, Z., LOCK, R. e FLIK, G. 1999. Metallothionein response in gills of *oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *am. j. physiol.* 277: 320-331.
- DAOUST, P.Y., WOBESER, G. e NEWSTE, A.D. 1984. Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gills of rainbow trout. *Vet. Pathol.* 21: 93-101.
- DAUTREMEPUITS, C., BETOULLE, S. e VERNET, G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp (cestoda). *Biochem. Biophys. Acta* 1573: 4-8
- DE BOECK, G., NILSSON, G.E., ELOFSSON, U., VLAEMINCK, A. e BLUST, R. 1995. Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquatic toxicology* 33: 265-277.
- DE FILIPPIS, L.F. e PALLAGHY, C.K. 1994. Heavy metals: Sources and Biological effects. In: RAI, LC., GAUR, J.P., SOEDER, C.J. (eds). Algae and water pollution. *Archv. Fur hydrobiology-Ergebnisse der Limnologie* 42: 31-77.
- DE VLAMING, V., CONNOR, V., DIGIORGIO, C., BAILEY, H.C., DEANOVIC, L.A. e HINTON, D.E. 2000. Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 42-62.
- DENEKE, S., FANBURG, B.B.L. 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257: L163
- DEPLEDGE, M.H. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M.C. e LEONZIO, C. (eds). Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Boca Raton, Lewis Publishers, pp 271-285.
- DEPLEDGE, M.H., AMARAL-MENDES, J.J., DANIEL, B., HALBROOK, R.S., KLOEPPERSAMS, P., MOORE, M.N., e PEAKALL, D.B. 1993. In: PEAKALL, D.B. e SHUGART, L.R. (eds). The conceptual basis of the biomarkers approach. NATO ASIS Series. VI. H68 BIOMARKER pp. 15-29
- DESCOTES, J. 1986. Immunotoxicology of drugs and chemicals. Amsterdam: Elsevier sciences, 144p.
- DETHLOFF, G.M. e BAILEY H.C. 1998. Effects of copper on immune system parameters of rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Environmental toxicology chemistry* 17: 1807-1814.
- DÍAZ, A. O., GONZÁLEZ CASTRO, M., GARCÍA, A.M.; DEVINCENTI, C.V. e GOLDEMBERG, A.L. 1999. Morphological and histochemical characterisation of liver from stripped weakfish, *Cynoscion guatucupa* (CUVIER, 1830). *Biociências* 7:67-78
- DICK, P.T. e DIXON, D.G. 1985. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology* 26: 475-481.

- DO VALE, A., AFONSO, A. e SILVA, M.T. 2002. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 183-198.
- EBELE, S., OLADIMEJI, A.A. e DARAMOLA, J.A. 1990. Molluscicidal and piscicidal properties of copper (II) tetraoxsulfate (IV) on *Bulinus globosus* (Morelet) and *Clarias anguillaris* (L.). *Aquatic Toxicol.* 17: 231-238
- EL-AZIZ, E.S. 1997. Biochemical, residual and histopathological studies in catfish (*Clarias lazera*) exposed to some molluscicides. *Vet. Med. J. Giza.* 45: 61-73.
- ELLIS, A. E. 1981. Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. In: PICKERING, A.D. (ed) Stress and Fish. London: Academic Press, pp.147-169
- ERICKSON, S.J. 1972. Toxicity of copper to a marine diatom in unenriched inshore seawater. *J. Phycol.* 8: 318-323.
- EWERS, U. e SCHLIPKOTER, H.W. 1991. Intake, distribution and excretion of metals and metal compounds in human and animals. In: MERIA, E. (Ed.), Metals and Their Compounds in the Environment; Occurrence, Analysis and Biological relevance. VHC Weinheim. pp. 571–583.
- FABER, M.J., SMITH, L.M.J., BOERMANS, H.J., STEPHENSON, G.R., THOMPSON, D.G. e SOLOMON, K.R. 1997. Cryopreservation of fluorescent marker labeled algae (*Selenastrum capricornutum*) for toxicity testing using flow cytometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1059-1067.
- FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43: 61-68.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FERREIRA-CARDOSO, J.V., GARCIA-SANTOS, S., MONTEIRO, S.M., CARROLLA, J., MATOS, P. e FONTAINHAS-FERNANDES, A. 2007. Histopathological changes in liver and Gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne Copper. *Pesq. Vet. Bras.*, 27:103-109
- FRANKLIN, N.M., STAUBER, J.L. e LIM, R.P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 160–170.
- FRANKLIN, N.M., STAUBER, J.L., APTE, S.C. e LIM, R.P. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 742–751.
- GARCIA-SANTOS, S., MONTEIRO, S.M., CARROLLA, J. e FONTAINHAS-FERNANDES, A. 2007. Alterações histológicas em brânquias de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo Cadmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59: 376-381.
- GHATE, H.V. e MULHERKAR, L. 1979. Histological changes in the gills of two freshwater prawn species exposed to copper sulphate. *Ind. J. Exp. Biol.* 17: 838-840.

- GIRON-PEREZ, M. I., SANTERRE, A., GONZALEZ, J.F., CASAS-SOLIS, J., HERNANDEZ-CORONADO, M., PEREGRINA-SANDOVAL, J., TAKEMURA, A. e ZAITSEVA, G. 2007. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish and Shellfish Immunology* 23: 760-769.
- GRATZEK, J.B. 1983. Control and therapy on fish diseases. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27: 297-323.
- GROSELL, M.H., McGEER, J.C. e WOOD, C.M., 2001. Plasma copper clearance and biliary excretion are stimulated in copper acclimated trout. *Am. J. Physiol.* 280: 796–806.
- GULLEY, D.D. BOELTER, A.M. e BERGMAN, H.L. 1991. Toxtat 3.3.: Fish Physiology and toxicology Laboratory. Dept. Zool. And Physiol., Univ. WY, Laramie, WY.
- GUPTA, A.K. e RAJBANSHI, V.K. 1981. Measurement of acute toxicity of copper to the freshwater teleost, *Mystus bleekeri* (Davi) using bioassay, statistical and histopathological methods. *Arch. Hydrobiol.* 91: 427-434.
- GUSMÃO, L.F.M. 2004. Efeitos do cobre e cromo na comunidade zooplanctonica: Um estudo experimental em mesocosmos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos.
- GUTTERIDGE, J.M.C. 1993. Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications* 19: 141-158.
- HABIG, W.H. PABST, M.T. e JACOBY, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzyme step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139
- HALEY, M.V., JOHNSON, D.W., HART, G.S., MUSE, W.T. e LANDIS, W.G., 1986. The toxicity of brass dust to the microalgae *Ankistrodesmus falcatus* and *Selenastrum capricornutum*. *J. Appl. Toxicol.* 6: 281–285.
- HALL, R. e MALIA, R.G. 1986. Medical laboratory Hematology, Butterworths; London, 294 p
- HALLIWELL, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623
- HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- HEATH, A.G. 1991. Effect of water-borne copper on physiological response of bluegill (*Lepomis mossambicus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. *Com. Biochem. Physiol. C* 100:559-564
- HEATH, A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 245p.
- HEBBEL, R.P. 1986. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab Clin. Med.* 107:401-404
- HELLAWELL, J. M. 1986. *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*. London: Elsevier, 509 p.

- HENAREZ, M.N.P., CRUZ, C., GOMES,G.R., PITELLI, R..A. e MACHADO, M.R.F. 2007. toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do diquate na brânquia e no fígado do piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente* 17: 107-116.
- HENAREZ, M.N.P., CRUZ, C., GOMES,G.R., PITELLI, R. A., e MACHADO, M, R. F. 2008. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30: 77-82
- HERSHKO C. 1989. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 26: 277-85
- HINTON, D.E. e LAUREN, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity of fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F., SHUGART, L.R., (eds). Biomarkers of environmental contamination. Boca raton: Lewis publishers, pp. 17-57.
- HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C. e CAEZEKOWITZ, R.A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318
- HORNE, A.J. e GOLDMAN, C.E. 1974. Supression of nitrogen fixation by blue-green algae in a eutrophic lake with trace additions of copper. *Science* 183: 409-411
- HYLANDER, L.D., PINTO, F.N., GUIMARÃES, J.R.D., MEILI, M. OLIVEIRA, L.J. e SILVA, E.C. 2000. Fish mercury concentration in the Alto Pantanal, Brazil: influence of season and waters parameters. *The Science of the Total Environment* 261: 9-20.
- ISHIKAWA, N.M, RANZANI-PAIVA, M.J.T., LOMBARDI, J.V. e FERREIRA, C.M. 2007. Hematological Parameters in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus* Exposed to sub-lethal concentrations of Mercury. *Brazilian archives of biology and technology* 50: 619-626
- JIANG, Z-Y., HUNT, J.V. e WOLFF, S.P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202: 384-389
- JIANG, Z-Y., WOOLLARD, A.C.S. e WOLFF, S.P. 1991. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853-856
- JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. 2004. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- KAHRU A., IVASK A., KASEMETS K., PÕLLUMAA L., KURVET, I., FRANCOIS M. e DUBORQUIER, H.C. 2005 .Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead and cadmium. *Environ Toxicol Chem.* 24: 2973–2982.
- KALLQVIST, T., MILACIC, R. SMITAL,T., THOMAS,K.V. VRANES, S. e TOLLEFSEN, K.E. 2008. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research.* 42: 2146 – 2156

- KARAN, V., VITOROVIC, S., TUTUNDIZIC, V. e POLEKSIC, V. 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulphate exposure and recovery. *Ecotoxicological and Environmental safety* 40: 49-55.
- KEEN, J.H., HABIG, W.H. e JAKOBY, W.B. 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251: 6183-6188
- KHALLAF, E.A., GALAL, M. e AUTHMAN, M., 1998. Assessment of heavy metals pollution and their effects on *Oreochromis niloticus* in aquatic drainage canals. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* 26B: 39-74.
- KHALLAF, E.A., GALAL, M. e AUTHMAN, M., 2003. The biology of *Oreochromis niloticus* in a polluted canal. *Ecotoxicology* 12:405-416.
- KHANGAROT, B.S. e TRIPATHI, D.M. 1991. Change in humoral and cell-mediated immune response and in skin and respiratory surfaces of catfish *Saccobranchus fossilis*, following copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 22: 291-308.
- KLEINOW, K.M., NICHOLS, J.W., HAYTON, W.L., MCKIM, J.M, E BARRON, M.G. 2008. Toxicokinetics in Fishes In: Di GIULIO, R.T. e HINTON, D.E. (Eds). *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, pp 55-154.
- KLIMA, K.E. e APPLEHANS, F.M. (1990). Copper exposure and the degeneration of olfactory receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chem. Spec. Bioavail.* 2: 144-154.
- KNITTEL, M.D. 1981. Susceptibility of steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. *Journal of fish diseases* 4: 33-40
- KOIVISTO, S., KETOLA, M. e WALLS, M. 1992. Comparison of five cladoceran species in short and long-term copper exposure. *Hydrobiologia* 248: 125-136
- KOWOLENKO, M., McCRAVE, M.J. e LAWRENCE, D.A. 1992. Metal-induced alteration of immunity. In: MEWCOMBE, D.S., ROSE, N.R. e BLOOM, J.C (eds). *Clinical Immunotoxicology* New York, Raven Press, pp. 401-419.
- KRAEMER, L.D, CAMPBELL, P.G.C. e HARE, L. 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular reactions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138: 324-337.
- LAMPERT, W. e SOMMER, U. 1997. *Limnology: The ecology of lakes and streams*. New York: Oxford University Press, 382 p
- LATIF, M. e LICEK, E. 2004. Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbioassays. *Environ. Toxicol.* 19: 302-309.
- LAURÉN, D.J. e MACDONALD, D.G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 99-104

- LAUREN, D.J. e McDONALD, D.G. 1985. Effects of copper on branchial ion regulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Com. Physiol. B* 155: 635-644.
- LEASE, H.M. 2003. Structural changes in gills of lost river suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Com. Biochem. Physiol. C, Comp.* 134: 491-500
- LEVINA, E.N. 1972. *Obshchaya Toksikologiya Metallov.* (general Toxicology of metals). Leningrad Meditsina Press, 184p.
- LEVY, J.L., STAUBER, J.L. e JOLLEY, D.F. 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of Total Environment* 387: 141-154.
- LEWIS, A.G. e CAVE, W.R. 1982. The biological importance of copper in oceans and estuaries. *Oceanograf. Mar. Biol Annu. Ver.* 20: 471-265.
- LING, K.H., SIN, Y.M. e LAM, T.J. 1993. Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot diseases) in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 118: 23-35.
- LING, R.H. e TAN, C.S. 1990. Control and treatment of some parasites and diseases of freshwater ornamental fish. In: *Aquaculture Proceedings, First International Aquarium Fish and Accessories Conference.* Academic Associates Singapore, pp. 81-88.
- LOMBARDI, J.V., 2004, Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI PAIVA, M.J.T. (ed) *Sanidade de organismos aquáticos.* São Paulo:Varela, pp. 263-272
- LORZ, H.W. e McPHERSON, B.P. 1976 Effects of copper and zinc in fresh water fish on the adaptation to sea water and ATPase activity and effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus Kisutch*). *J. Fish. Res. Board. Can.* 1: 2023-2030.
- LWANGA, M.S., KANSIIME, F., DENNY, P. e SCULLION, J. 2003. Heavy metals in Lake George, Uganda, with relation to metal concentrations in tissues of common fish species. *Hydrobiologia* 499: 83-93.
- MACFARLANE, R.D., BULLOCK, G.L. e McLAUGHLIN, J.J.A. 1986. Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 227-231.
- MALLAT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: a statistical review. *Can. J.Fish.Aquat.Sci.* 42: 630-684.
- MARGALEF, R. 1983 *Limnologia.* Ediciones Omega S.A. Barcelona. 1010p.
- MATÈS, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104
- MATUSHIMA, E. R. e MARIANO, M. 1996. 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.* 33: 5-10.

- MAXIMIANO, A.A., FERNANDES, R.O., NUNES, F.P., ASSIS, M.P., MATOS, R.V., BARBOSA, C.G.S. e OLIVEIRA-FILHO, E.C. 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: Demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Ciência & Saúde Coletiva* 10: 483-491.
- MAZON A. F. e FERNANDES M. N. 1999. Toxicity and Differential Tissue Accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:797-804
- MAZON, A.F., PINHEIRO, G.H.D., e FERNANDES, M.N. 2002. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: Estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In: ESPINDOLA, E.L.G., PASCHOAL, C.M.R.B., ROCHA, O., BOHRNER, M.B.C. e NETO, A.L.O. (Eds). *Ecotoxicologia: Perspectiva para o século XXI*. São Carlos: Rima, pp 327-340.
- MEISTER, A. e ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711- 760.
- MELLO-FILHO, A.C., HOFFMAN, M.E. e MENEGHINI, R.. 1983. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra cellular iron. *Biochem J.* 218: 273-275.
- MORAN, D.T., ROWLEY, J.C., AIREN, G.R. e JAREF, B.W. 1992. Ultrastructural neurobiology of the olfactory mucosa of the brown trout *Salmo trutta*. *Micr. Res. Tech.* 23: 28-48.
- MOUNT, D.I. e NORBERG T.J. 1984. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 3: 425-433.
- MUNZINGER, A. e MONICELLI, F. 1991. A comparison of sensitivity of three *Daphnia magna* populations under heavy metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2: 24-31.
- MURRAY-GULDE, C.L., HEATLEY, J.E., SCHWARTZMAN, A.L. e RODGERS, JR. 2002. Algicidal Effectiveness of Clearigate, Cutrine-Plus, and Copper Sulfate and Margins of Safety Associated with Their Use. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 19-27.
- NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M. e NIPPER, M. 2002 *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações do Brasil*. São Paulo, 262 p.
- NASCIMENTO, I.A., PEREIRA, S.A., e LEITE, M.B.N.L. 2008. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. (Eds). *Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, pp. 413-432.
- NEFF, J.M. 1984. Use of biochemical measurements to detect pollutant mediated damage to fish. In: CARDWELL, R.D., PURDY, R. e BAHNER, R.C. (eds), *Aquatic toxicology and Hazard Assessment, Seventh Symposium, ASTM STP 854*. American Society for Testing and Materials Philadelphia, pp. 155-183.
- NORBERG – KING, T.J. 1993 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. 13p

- NOWAK, B. 1992. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquat. Toxicol.* 23: 65-84 .
- NUSSEY, G. VAN-VUREN, J.H.J. e DU-PREEZ, H.H., 1995. Effect of copper on the differential white blood cell count of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C.* 111: 381-388
- O' NEILL, J.G. 1981. The humoral immune response of *Salmo trutta* and *Cyprinus carpio* L. exposed to heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 297-302
- ODUM, E.P. 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *Bioscience* 35:419-422
- O'HARA, J. 1971. Alterations on oxygen consumption by blue gills exposed to sublethal treatment with copper. *Water Res.* 5:321-327.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., GUIMARÃES, J.R.D. e PFEIFFER, W.C. 1996. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34: 190-195.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., FILIPAK NETO, F., MELA, M.; SILVA, P.H., RANDI, M.A.F., RABITTO, I.S., ALVES COSTA, J.R.M. e PELLETIER, E. 2006. Hematological finding in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research* 101: 74-80
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., PELLETIER, E., PFEIFFER, W.C. e ROULEAU, C. 2000. Comparative uptake, bioaccumulation and Gill damages of inorganic Mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research Section A.* 83: 286-292.
- OLSON, K.K., SQUIBB, K.S. e COUSINS, R.J. 1978. Tissue uptake, subcellular distribution, and metabolism of $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$ and $^{203}\text{CH}_3\text{HgCl}$ by *Rainbow trout, Salmo gairdneri*, *J. Fish. Res. Board Can.* 355: 381-390.
- PARIS-PALACIOS, S., BIAGIANTI-RISBOURG, S. e VERNET, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *Aquatic Toxicol.* 50: 109-124
- PARKHURST, B.R., FORTE, J.L. e WRIGHT, G.P., 1981. Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 1-8.
- PAVANELLI, G. C., EIRAS, J.C. e TAKEMOTO, R.M. 2002. Doenças de peixes: profilaxia diagnóstico e tratamento. Maringá. EDUEM, 305p.
- PEDRAJAS, J.R., PEINADO, J. e LOPEZ-BAREA, J. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98:267-282
- PEDROZO, M.F.M. 2003. Cobre. In AZEVEDO, FA e CHASIN, A.A. (eds). *Metais: Gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: editora Atheneu. pp. 143-185.

- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M. e WENDELAAR BONGA, S.E. 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology* 32: 303-320
- POLEKSIC, V. e MITROVIC-TUTUNDIZI, V. 1994. Fish gills monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R. e LLOYD, R. (eds) Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fishes United Nation, Fishing News Books. pp 339-352.
- PORVARI, P. 1995. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in river Mojú in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. *The Science of the Total Environment* 175: 109-117.
- PRESING, M., 1981. Effects of Dikonirt (sodium salt of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid) on the mortality and reproduction of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 83: 511-516.
- QIAO-QIAO, C., GUANG-WEI, Z. e LANGDON, A. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 19: 1500–1504
- RADI, A.A. e MATKOVICS, B. 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of Carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol C*. 90: 69–72.
- RADIX, P., LEÂONARD, M., PAPANTONIOU, C., ROMAN, G., SAOUTER, E., GALLOTTI-SCHMITT, S, THIEÂBAUD, H. e VASSEUR, P. 2000. Comparison of Four chronic Toxicity Tests Using Algae, Bacteria, and Invertebrates Assessed with Sixteen Chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47: 186-194
- RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington. Publinsing Hemisphere, 665 p
- RANDI, A.S., MONSERRAT, J.M., RODRIGUEZ, E.M. e ROMANO, L.A. 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayane* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *Journal of fish diseases* 19: 311-322.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. 1995 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* 22: 1-22.
- REYNOLDSON, T.B. e DAY, K.E. 1993. Freshwater sediments. In: COLLOW, P. (ed) *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publication, pp.83-100.
- ROCHA, O., SENDACZ, S. e MATSUMURA – TUNDISI, T. 1995 Composition, Biomass and Productivity of zooplâncton in Natural Lakes and Reservoirs of Brazil. In: TUNDISI, J.G., BICUDO, C.E.M. e MATSUMURA – TUNDISI, T. (Eds) *Limnology in Brazil*. Rio de Janeiro, pp. 151-166.
- RODRIGUES, L. H. R.; ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUES, M. T.; FONTOURA, N. F., 2003. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. *Biociências*, Porto Alegre, 11(2): 137-133.

- RODRIGUEZ-ARIZA, A., PEINADO, J., PUEYO C. e LOPEZ-BAREA, J. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of fisheries and aquatic science* 50: 2568-2573.
- ROJIK, J. NEMCSOK, J.G. e BOROSS, L. 1983. Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fish affected by pesticides *Acta Biol. Hung.* 34: 81-92.
- ROMEO, M., BENNANI, N., GNASSIA-BARELLI, M., LAFAURIE, M. e GIRARD, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic toxicology* 48: 185-194
- ROSENFELD, G. 1947. 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* 20: 329-334.
- ROTA, M.A. 2003. Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. Documentos 53. Embrapa pantanal. Corumbá.
- ROUGIER, F.P. TROUTAUD, D., NDOYE, A. e DEUSCHAUD, P. 1994. Non-specific immune response of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. *Fish. Shellfish. Immunol.* 4: 114-127.
- ROVER-JUNIOR, J., HOEHR, N.F. e VELLASCO, A.P. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associada a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quimica Nova* 24: 112-119.
- SANCHEZ, W., PALLUEL, O., MEUNIER, L., COQUERY, M., PORCHER, J.M. e AIT-AISSA, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 177-183.
- SANTANNA, C. L. e AZEVEDO, M.T.P. 2000. Uma ameaça à qualidade da água. *Pesquisa Fapesp* 53: 28-30.
- SCHWARTZ, M.L. e VIGNEAULT, B. 2007. Development and validation of a chronic copper biotic ligand model for *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat Toxicol.* 84: 247-254.
- SCHWINGEL, A.R., CURTIUS, A.J. e POZEBON D. 2000. Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchem. J.* 64: 105-110.
- SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205.
- SEVRIN-REYSSAC, J. e PLETIKOSIC, M. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture* 88: 1-20.
- SHAN, X., A.W., T.Y., JONES, D.P. 1990. Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol ther.* 47, 61-71

- SHARIFF, M., JAYAWARDENA P.A.H.L., YUSOFF, F.M. e SUBASINGHE, R. 2001. Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish e Shellfish immunology* 11: 281-291.
- SHAW, B.J. e HANDY, R.D. 2006. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology* 76:111-121
- SICKO-GOAD, L e STOERMER, E. F. 1988. Effects of toxicants on phytoplankton with special reference to the Laurentian Great Lakes. In: EVANS, M.S. (Ed.). *Toxic contaminants and ecosystem health – A great lakes focus*. Advances in Environmental Science and Technology, Nova York, pp.1-19.
- SIES, H., 1999. Glutathione and its role in celular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.
- SILVA, J.R.M.C., STAINES, N.A., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., PORTO-NETO, L.R. e BORGES J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology* 60: 466-478.
- SILVA, J.R.M.C., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S. e JENSCH-JUNIOR B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology* 28: 326-328.
- SINGH, M. 1995. Hematological responses in a freshwater teleost *Channa punctatus* to experimental copper and chromium poisoning. *J. Environmental Biol.* 16: 339-341.
- SINGH, M. e REDDY, T.V. 1990. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry and hepatosomatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20: 30-35.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. e ROCHA, O. 2001, *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*. São Carlos.
- SORENSEN, E.M. 1991. Copper. In: SORENSEN, E.M.(ed) *Metal poisoning in Fish*. Boca Raton: CRC Press, pp 235-284
- STEEMAN NIELSEN, E. e KAMP NIELSEN, L. (1970). Influence of deleterious concentrations of copper on the growt of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Pl.* 23: 828-840.
- STEEMAN-NIELSEN, E. e WIUN ANDERSEN, S. 1970. Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Mar. Biol.* 6: 93-97.
- SVOBODA, M., LUSKOVA, V., DRASTICHOVA, J. e ILABEK, V. 2003. The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet.* 70: 457-465.
- TAVAREZ-DIAS, M., MARTINS, M.L., SCHALCH, S.H.C., ONAKA, E.M., QUINTANA, C.I.F., MORAES, J.R.E. e MORAES, F.R. 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scientarium* 24: 547-554.

- TUCKER, C.S. e BOYD, C.E. 1985. Water quality. In: TUCKER, C.G. (ed). *Channel catfish culture Developmets in Aquaculture and Fisheries Science*. Amsterdan: Elsevier, pp 135-227.
- UAUY, R. OLIVARES, M, GONZALEZ, M. 1998. Essenciality of copper in humans. *Am. j. clin. nutr.* 67: 962-959
- ULEVITCH R.J. 2000. Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunol. Res.* 21: 49-54.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 1996. Algal toxicity tiers I and II. Series 850— Ecological effects test guidelines. Washington DC:USEPA. OPPTS 850.5400. EPA/712/C-96/164.
- VALENTI, W.C., POLI, C.R., PEREIRA, J.A. e BORGHETTI, J.R.. 2000. *Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília:CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia. 399 p
- VAN VUREN, J.H.J. 1986. The effects of toxicants on the hematology of *labeo umbratus* (Teleostei: Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol C.* 93: 155-159.
- VAN VUREN, J.H.J. 1994. The effects of cooper on the blood chemistry of *Clarias gariepinus* (Clariidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29: 187-199.
- VARANKA, Z., ROJIK, I., VARANKA, I., NEMESOK, J. e ABRAHAM, M., 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp.Biochem. Physiol. C.* 128: 467–478.
- VIARENGO, A., PERTICA, M., MANCINELLI, G., DAMONTE, G. e MATINO, G. 1989. Biochemical characterization of plasma membrane Ca, Mg-AT-Pase from gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Proc.* 12th ESCPB conference, Utrecht.
- VIDOTTI, E.C. e ROLLEMBERG, M.C.E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quím. Nova* 27: 139-145.
- VIJAYAVEL, K., GOPALAKRISHNAN, S., THILAGAM, H. e BALASUBRAMANIAN, M.P. 2006. Dietary ascorbic and α -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *terapon jarbua*. *Science of total Environment* 372: 157-163
- WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. e PEAKALL, D.B. 1997. Principles of ecotoxicology. Taylor e Francis. 321p.
- WEBB, M. 1979. The metallothioneins. In: WEBB, M. (ed). The chemical, Biochemical and Biology of cadmium. Amsterdan: Elsevier, pp. 195-266
- WEEKS, B. A., WARINER, J.E., MASON, P.L. e MCGINNIS, P. 1986. Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages. *Journal of fish biology* 28: 653-658

- WEI, D., KISUNO, A., KAMEYA, T. e URANO, K. 2006. A new method for evaluating biological safety of environmental water with algae, daphnia and fish toxicity ranks. *Sci. Total Environ.* 371: 383-390.
- WEPENER, V. VAN VUREN, J.H.J. e DU PREEZ, H.H. 1992. Effect of manganese and iron at a neutral and acid pH on the hematology of the banded tilapia (*Tilapia sparrmani*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 613-619.
- WESTER, P.W. e ROGHAIR, C.J. 1994. Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach. In: MULLER, R. e LLOYD, R. (eds) Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fishes, United Nation, Fishing News Books. pp 339-352.
- WHO (World Health Organization). Copper. 1998. (Environmental health criteria 200). Geneva.
- WONG, P.P.K., CHU, L.M. e WANG C.K. 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environment International* 25: 417-422.
- XU, F., TAO, S., DAWSON, R.W., LI, P. e CAO, J. 2001. Lake ecosystem health assessment : an indicators and methods. *Water Research* 35: 3157-3167
- YAMAMOTO, Y., ISHII, T. e IKEDA, S. 1997. Studies on copper metabolism in fish. II. The site of copper accumulation in the tissues of carp. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 43:1327:1332.
- ZELIKOFF, J.T. 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology* 129: 63-71.
- ZELIKOFF, J.T., RAYMOND, A., CARLSON, E., LI, Y., BEAMAN J.R. e ANSERSON, M. 2000. Biomarkers of immunotoxicity in ocean. *Toxicol let* 112/113:325-331