

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

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO MERCÚRIO EM
TILÁPIA “TAILANDESA”, *Oreochromis niloticus*.
DETERMINAÇÃO DA CL_{50-96h} E ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS**

Nilton Massuo Ishikawa

Jaboticabal – SP
Fevereiro/2003

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

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO MERCÚRIO EM
TILÁPIA “TAILANDESA”, *Oreochromis niloticus*.
DETERMINAÇÃO DA CL_{50-96h} E ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS**

Nilton Massuo Ishikawa

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

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

Jaboticabal – SP
Fevereiro/2003

Hoje você é um bom limpador de peixes,
mas você tem a oportunidade de no futuro ser um doutor

Se no futuro você conseguir ser um doutor

Você pode limpar peixes a hora que quiser

O inverso não...

Eunice Akemi Ishikawa

DEDICATÓRIA

Compartilho esta conquista com meus pais Masuzo
Ishikawa (in memorian) e Tizuka, e com meus irmãos,
Akira, Akemi
e Massumi

Agradecimentos

- A Deus, pela oportunidade de estar realizando mais uma vez um grande desafio.
- A profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva, carinhosamente como Masé, por todos os ensinamentos, paciência, compreensão, amizade e brilhante orientação nesta dissertação.
- Ao prof. Dr. Julio Vicente Lombardi, grande amigo e co-orientador neste trabalho.
- Aos membros da banca, prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e a profa. Dra. Angela Teresa Silva e Souza pelas correções e sugestões a este trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (processo n. 01/03182-5), que permitiu a concretização deste projeto.
- Ao Instituto de Pesca de São Paulo, pela estrutura e apoio recebido durante a condução deste trabalho.
- Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade oferecida.
- A piscicultura Aquabel pelo profissionalismo e confiança no fornecimento dos peixes.
- Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros pela ajuda nas análises estatísticas.
- A minha querida tia Tieko, pela simpatia e hospitalidade em todos os momentos em que estive em São Paulo.
- A todos os amigos do Instituto de Pesca (estagiários, pesquisadores e funcionários) que colaboraram para a realização deste experimento.
- Ao laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (CAUNESP), que possibilitou as leituras das lâminas sangüíneas.

- A todos os amigos do CAUNESP (professores, pós-graduandos, estagiários e funcionários) simplesmente por serem amigos sinceros, principalmente nos momentos difíceis e sem dúvida nos momentos de alegrias.
- Aos grandes amigos, irmãos companheiros de República, onde convivemos ocasiões inesquecíveis e também muitos momentos de escassez, no entanto, sempre com muita alegria.
- Enfim, a todos as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos de coração.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências.....	5
CAPÍTULO 1.....	10
TOXICIDADE AGUDA DO MERCÚRIO PARA A TILÁPIA “TAILANDESA”, <i>Oreochromis niloticus</i>.....	10
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Material e métodos.....	14
Resultados e discussão.....	16
Conclusões.....	22
Referências.....	23
CAPÍTULO 2.....	29
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TILÁPIA “TAILANDESA”, <i>Oreochromis niloticus</i> EXPOSTAS AS CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE MERCÚRIO.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados e discussão.....	37
Conclusões.....	44
Referências.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1.....	10
Tabela 1 – Variáveis físicas da água no teste de toxicidade aguda em Tilápia (<i>O. niloticus</i>), variedade tailandesa, exposto ao Hg. São Paulo, 2003.....	16
Tabela 2 – Variáveis químicas da água no teste de toxicidade aguda em Tilápia (<i>O. niloticus</i>), variedade tailandesa, exposto ao Hg. São Paulo, 2003.....	16
Tabela 3 – Porcentagem cumulativa e média de mortalidade em tilápia tailandesa, <i>O. niloticus</i> em função do tempo, no teste de toxicidade aguda com Hg, nas três repetições, São Paulo, 2003.....	18
Tabela 4 - Valores de CL _{50-96h} para o Hg em diferentes espécies de peixes.....	19
Tabela 5 - Concentrações de Hg recomendadas segundo alguns padrões nacionais e internacionais de qualidade de água, São Paulo, 2003.....	21
CAPÍTULO 2.....	29
Tabela 1 – Variáveis físicas da água no teste de toxicidade crônica em <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta ao Hg, São Paulo, 2003.....	37
Tabela 2 – Variáveis químicas da água no teste de toxicidade crônica em <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta ao Hg, São Paulo, 2003.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.....	10
Figura 1. Estrutura dos aquários utilizados no teste de toxicidade aguda para alevinos de <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, expostos ao Hg, São Paulo, 2003.....	15
CAPÍTULO 2.....	29
Figura 1. Estrutura dos aquários utilizados nos testes de toxicidade crônica em <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta ao Hg São Paulo, 2003.....	34
Figura 2. Colheita de sangue por punção caudal em <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, São Paulo, 2003.....	35
Figura 3. Variação dos valores médios obtidos para as características eritrocíticas em tilápia, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hg, nos diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003.....	39
Figura 4. Valores médios do número total de trombócitos de tilápia, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hg em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003.....	41
Figura 5. Células sangüíneas observadas em tilápia, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa Rosenfeld. 1000 x.....	41
Figura 6. Variação dos valores médios obtidos para os números absolutos de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos em sangue periférico de tilápia, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta a varias concentrações de Hg, nos diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003.	42

APÊNDICES

CAPÍTULO 2.....	29
Apêndice 1 – Média e desvio padrão das análises sangüíneas da série vermelha de tilápias, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta às várias concentrações de Hg em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003.....	51
Apêndice 2 - Média e desvio padrão das contagens globais e diferenciais de leucócitos de tilápia, <i>O. niloticus</i> , variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hg em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003.....	52

INTRODUÇÃO GERAL

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécies mais indicadas para o cultivo intensivo (CASTAGNOLLI, 1992), principalmente em países tropicais como o Brasil, onde as temperaturas favorecem seu desempenho. Suas características zootécnicas e alta qualidade de carne fazem da tilápia um produto de grande interesse para a aquicultura e para o processamento industrial. Atualmente são criadas em boa parte do país, com exceção apenas de alguns estados da região norte (OSTRENSKY *et al.*, 2000).

A aquicultura atual, como uma atividade economicamente emergente, encontra-se inteiramente dependente dos ecossistemas nos quais está inserida, uma vez que os peixes vivem em contato estreito com o seu meio, e por isso são afetados pelas mudanças causadas por diferentes agentes físicos, químicos e biológicos (VALENTI *et al.*, 2000). Assim, a exploração econômica dos peixes requer conhecimentos básicos dos principais fatores que direta ou indiretamente estão ligados ao meio ambiente.

A presença de mercúrio (Hg) nos ecossistemas naturais está assumindo dimensões preocupantes, principalmente em decorrência de suas múltiplas aplicações, os quais na maioria das vezes se processam de forma abusiva e indiscriminada (CASTRO, 1991).

As fontes de mercúrio são classificadas em naturais (emissões vulcânicas, gaseificação da crosta terrestre e evaporação de corpos d'água) e artificiais (indústrias, mineração de ouro, extração de mercúrio, queima de combustíveis fósseis e laboratórios). As fontes naturais são imensas, sendo superior às artificiais, no entanto estas últimas podem ter considerável importância em termos de contaminação local do ambiente (CASTRO, 1991; SUNDERLAND e CHMURA, 2000). Segundo NRIAGU e PACYNA (1988), a emissão artificial de Hg mundialmente tem representado uma das principais fontes deste metal pesado e estima-se que as indústrias têm liberado aproximadamente 90 ng.L^{-1} Hg por ano em lagoas e rios. Além das indústrias, a mineração de ouro e a extração de mercúrio representam outras formas importantes de liberação e contaminação das águas, atingindo

várias populações como as que se alimentam de peixes da bacia Amazônica e do pantanal matogrossense brasileiro (SOUZA e BARBOSA, 2000; PORVARI, 1995; LACERDA *et al.*, 1990; BOURGOIN *et al.*, 2000 e HYLANDER *et al.*, 2000).

Uma característica importante deste metal é que ele pode ser transportado e depositado a longas distâncias, resultando em contaminações de regiões distantes do local da fonte de poluição (HERMANSON, 1998). Conseqüentemente, este fenômeno tem representado uma ameaça iminente à aquicultura, pois grande parte desta atividade é dependente da água dos rios e lagoas.

De acordo com as normas do CONAMA (1986), o limite máximo de mercúrio aceito para águas utilizada na criação natural ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana, é de $0,0002 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$.

Os peixes são concentradores naturais de mercúrio e o absorvem diretamente da água, através das suas membranas branquiais e pela sua alimentação (MATHERS e JOHANSEN, 1985 e MORAES *et al.*, 1997). A quantidade acumulada nos peixes depende da quantidade ingerida de alimento contaminado, da idade, do tamanho e principalmente do seu nível trófico, uma vez que ocorre acúmulo maior de mercúrio em peixes carnívoros (HOLSBECK *et al.*, 1997 e SOUZA e BARBOSA, 2000). WATRAS *et al.* (1998) acrescentam que condições exógenas como a concentração de mercúrio na água, pH, dureza, quantidades de matérias orgânicas e temperatura determinam a bioacumulação desse metal pesado nos ecossistemas e nos peixes.

Os peixes atuam, então, como um importante recurso, exercendo a função de bio-indicadores de áreas possivelmente contaminadas com o mercúrio de origem natural ou artificial (PORVARI, 1995 e HYLANDER *et al.*, 2000).

A contaminação por Hg nos peixes leva a alterações indesejáveis à saúde do animal, tais como a inibição dos processos metabólicos, baixa fecundidade, pequena taxa de sobrevivência e alteração da capacidade de defesa celular e humoral (MIKRYAKOV e

LAPIROVA, 1997). A intoxicação resulta em severos danos brânquiais, hepáticos e renais (PANDEY *et al.*, 1996 e BANO e HASAN, 1990). Em relação aos sinais clínicos BOLDRINI e PÁDUA (1983) relataram a rigidez do corpo, estiramento das nadadeiras, movimentos lentos, perda de equilíbrio, asfixia e, finalmente morte.

Vários autores enfatizam que o estudo das variáveis hematológicas constitui um meio auxiliar muito valioso e seguro na avaliação das condições biológicas no estado de normalidade (KAVAMOTO *et al.*, 1983; RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1986; PAIVA, 1991; RANZANI-PAIVA 1996; TAVARES-DIAS e FAUSTINO, 1998; BEELEN *et al.* 1998; RIBEIRO *et al.*, 1999; TAVARES-DIAS *et al.*, 1999a) e patológicas (RANZANI-PAIVA *et al.* 1987, 1997; TAVARES-DIAS *et al.*, 1999b; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2000) dos peixes. Neste sentido, diversos trabalhos vêm sendo realizados, como o de GWOZDZINSKI (1992) que analisou as alterações sangüíneas em *Cyprinus carpio*, exposto ao mercúrio e descreveu a ocorrência de hemólise das células vermelhas do sangue. LOW e SIN (1998), realizaram um bioensaio com *Trichogaster trichopterus*, expostos ao cloridrato de mercúrio e notaram a inibição da atividade da lisozima renal e a proliferação de linfócitos “in vitro”. MICRYAKOV e LAPIROVA (1997) relataram que a intoxicação por cloreto de mercúrio causou diminuição da taxa de hemoglobina e do número de leucócitos em *Acipenser baeri*. DAWSON (1990) referiu leve aumento no hematócrito e diminuição na taxa de hemoglobina em *Scophthalmus aquosus* submetido a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a qualificação e a mensuração dos efeitos dos produtos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ao ambiente. Para efeito de monitoramento de um corpo de água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, os testes mais utilizados são os de avaliação das toxicidades aguda e crônica. Nos testes de toxicidade aguda, os organismos são expostos aos agentes tóxicos durante curto período de tempo determinando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀). Nos testes de toxicidade crônica o tempo de exposição envolve períodos mais longos com concentrações sub-letais, no qual

se avalia os parâmetros de comportamento, alterações fisiológicas e morfológicas. Assim, o impacto dos poluentes sobre os organismos aquáticos pode ser estimado e monitorado por testes de toxicidade em condições de laboratório (RAND e PETROCELLI, 1985).

Assim, os estudos da relação dos componentes bióticos e abióticos do ecossistema, uma importante ferramenta para assegurar a qualidade do meio ambiente, da produção aquícola e principalmente da saúde pública.

O presente estudo tem como objetivos determinar a concentração letal média (CL₅₀) e avaliar os efeitos da intoxicação crônica por mercúrio no o quadro hematológico de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*).

REFERÊNCIAS

- BANO, Y. e HASAN, M. 1990. Histopathological lesions in the body organs of cat-fish, *Heteropneustes fossilis* following mercury intoxication. Journal of Environmental Science Health, part B, 25 (1): 67 – 85.
- BEELEN, R.; HEIJDEN, T. van der; BOOMS, R.; VERDEGEN, M.; PAVANELLI, G.C. 1998. Blood values of young Brazilian catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). Acta Scientiarum, 20(2): 147-150.
- BOLDRINI, C.V. e PÁDUA, H.B. 1983. Contaminação por mercúrio nos rios Mogi-Gaçu e Pardo (SP). Revista DAE, São Paulo, SABESP, 43 (135): 106 – 117.
- BOURGOIN, L.M.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J.; COURAU, P. 2000. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. The Science of the Total Environment, 260: 73 – 86.
- CASTAGNOLLI, N. 1992. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Funep. 189 p.
- CASTRO, A.C.L. 1991. Quantificação de mercúrio total em tecido muscular do dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849) do rio Mogi-Guaçu – SP. São Carlos, SP. 82 p. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- CONAMA. 1986. Resolução Nº 20, de 18 de Junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo 30/07/86: p. 11 – 356.
- DAWSON, M.A. 1990. Blood chemistry of the windowpane flounder *Scophthalmus aquosus* in Long Island Sound: Geographical, seasonal and experimental variations. Fishery Bulletin, U.S., 88: 429 – 437.

- GWOZDZINSKI, K. 1992. Structural changes of proteins in fish red blood cells after copper and mercury treatment. Archives of the Environmental Contaminant Toxicology, 23: 426 – 430.
- HERMANSON, M.H. 1998. Anthropogenic mercury deposition to Arctic lake sediments. Water Air Oil Pollut., 101: 309 – 321.
- HOLSBEEK, L.; DAS, H.K. e JOIRIS, C.R. 1997. Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish. The Science of the Total Environment, 198: 201 – 210.
- HYLANDER, L.D.; PINTO, F.N.; GUIMARÃES, J.R.D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L.J.; SILVA, E.C. 2000. Fish mercury concentration in the Alto Pantanal, Brazil: influence of season and water parameters. The Science of the Total Environment, 261: 9 – 20.
- KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. Boletim do Instituto de Pesca, 10 (único): 53 – 60.
- LACERDA, L.D.; PFEIFFER, W.C. e BASTOS, W.R. 1990. Mercury dispersal in water and sediments draining a gold mining tailing deposit in Poconé, Brazil. Univ. Fed. Fluminense and Univ. Fed. do Rio de Janeiro, Brazil.
- LOW, K.W. e SIN, Y.M. 1998. Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). The Science of the Total Environment, 214: 153 – 164.
- MATHERS, R.A. e JOHANSEN, P.H. 1985. The effects of feeding ecology on mercury accumulation in walleye (*Stizostedion vitreum*) and pike (*Esox lucius*) in Lake Simcoe. Canadian Journal of Zoology, 63: 2006 – 2012.

- MIKRYAKOV, V.R. e LAPIROVA, T.B. 1997. Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in juvenile *Acipenser baeri*. Journal of Ichthyology, 37 (6): 458 – 462.
- MORAES, L.A.F.; LENZI, E. e LUCHESE, E.B. 1997. Mercury in two fish species from the Paraná river floodplain, Paraná, Brazil. Environmental Pollution, 98 (1): 123 – 127.
- NRIAGU, J.O. e PACYNA, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soil by trace metals. Nature, 333: 134 – 139.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. 2000. Situação atual da aquicultura brasileira e mundial. p. 354 – 381. In: VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia. 399p.
- PAIVA, M.J.T.R. 1991. Características sangüíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science, 28 (2): 141-153.
- PANDEY, A.K.; GEORGE, K.C. e MOHAMED, M.P. 1996. Histopathological changes induced in gill of in estuarine mullet, *Liza parsia*, by sublethal exposure to mercuric chloride. Indian Journal of Fisheries., 43 (3): 285 – 291.
- 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.
- RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington, Publinshing. Hemisphere, 665 p.

- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1986. Hematological characteristics of the curimatá, ***Prochilodus scrofa*** Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental condition. Boletim do Instituto de Pesca, 13 (2): 115-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M.C. e CELIBERTO, R.J. 1987. Hematologia da carpa ***Cyprinus carpio***, infestada por ***Argulus*** sp. e após um tratamento com Fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetilo (Neguvon). Boletim do Instituto de Pesca. 14 (único): 83-92.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. 1996. Células sangüíneas e diferencial de leucócitos em pirapitinga do sul, ***Brycon*** sp., sob condições experimentais de criação intensiva. Revista Ceres, 43(250):685-696.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M.L. e PACHECO, F.J. 1997. Alterações hematológicas em curimatá, ***Prochilodus scrofa*** Steindachner, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). Boletim do Instituto de Pesca, 24 (especial): 187-196.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, G.C. E TAKEMOTO, R.M. 2000. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in ***Schizodon borelli*** (Osteichthyes, Anostomidae) and ***Prochilodus lineatus*** (Osteichthyes, Prochilodontidae). Acta Scientiarum, 22(2): 515-521.
- RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. e TJALVE, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (***Salvelinus alpinus***). Environmental Science Technology, 33: 902 – 907.
- SOUZA, J.R. e BARBOSA, A.C. 2000. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. Química nova na escola. Nº 12.

- SUNDERLAND, E.M. e CHMURA, G.L. 2000. An inventory of historical mercury emissions in Maritime Canada: implications for present and future contamination. *The Science of the Total Environment*, 256: 39 – 57.
- TAVARES-DIAS, M. e FAUSTINO, C.D. 1998. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo, ***Oreochromis niloticus*** (Cichlidae) em cultivo extensivo. *ARS Veterinária*, 14 (3): 254-263.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; CAMPOS-FILHO, E. e MORAES, F.R. 1999a. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã ***Brycon cephalus*** Günther, 1869 (Osteichthyes, Characidae). *Ars Veterinária*, 15(3): 149-153.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R. E PERECIN, D. 1999b. Hematologia de telósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do ***Leporinus macrocephalus*** Garavelo & Britiski, 1988 (Anostomidae e ***Piaractus mesopotamicus*** Holmberg, 1887 (Characidae). *Acta Scientiarum*, 21(2): 337-342.
- VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A. e BORGHETTI, J.R. 2000. Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável. CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. 399 p.
- WATRAS, C.J.; BACK, R.C.; HALVORSEN, S.; HUDSON, R.J.M.; MORRISON, K.A. e WENTE, S.P. 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *The Science of the Total Environment*, 219: 183 – 208.

Capítulo 1

TOXICIDADE AGUDA DO MERCÚRIO PARA A TILÁPIA “TAILANDESA”, *Oreochromis niloticus*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) através do teste de toxicidade aguda em tilápia de linhagem “Tailandesa”, *Oreochromis niloticus*, exposta a diversas concentrações de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) na água. O teste foi conduzido no laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca – SP, em ambiente climatizado. A metodologia foi padronizada de acordo com as recomendações expressas em APHA *et al.* (1989). Neste teste foram utilizados alevinos com peso médio de $0,41 \pm 0,12$ g e comprimento médio de $2,46 \pm 0,21$ cm. Os peixes foram mantidos em aquários contendo 5 litros de água e as concentrações de mercúrio correspondente à concentração desejada. Os aquários foram dispostos em uma bateria de três réplicas contendo 5 concentrações tóxicas: 0,037; 0,185; 0,370; 0,740 e 0,925 $mg.L^{-1}$ Hg, e mais um grupo controle. O teste foi conduzido por um período de 96 horas e a ocorrência de mortalidade registrada a cada 24 horas. Com os dados obtidos ao final do experimento, foi possível determinar, pelo método estatístico Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977) a concentração letal média (CL_{50-96}) de 0,1961 $mg.l^{-1}$ Hg para alevinos de tilápia expostos ao cloreto de mercúrio.

ABSTRACT

This paper reports the median lethal concentration (LC_{50-96}) of mercury by semi-static acute toxicity test, in “Tailand” tilapia, *Oreochromis niloticus*. The challenge was conducted in the Toxicology Laboratory – Instituto de Pesca, SP, with constant temperature. The methods used were those recommended by APHA *et al.* (1986) and the tests performed with alevins (mean length of 2.46 ± 0.21 cm and mean weight of 0.41 ± 0.12 g). The fish were kept in eighteen 5-liter glass aquaria filled with dechlorinated water plus the mercury of the following concentrations (control, 0.037, 0.185, 0.370, 0.740, 0.925 $mg \cdot L^{-1}Hg$) during 96 hours. The mortality was registered every 24 hours. Was determined, by the Trimmed Spearman Karber statistic method (HAMILTON *et al.* 1977). The median lethal concentration (LC_{50-96}) of 0.1961 $mg \cdot L^{-1}Hg$ of mercury for tilapia alevin.

INTRODUÇÃO

A criação de peixes, atualmente ocupa um importante papel na aquicultura mundial, sendo responsável por aproximadamente 52% de toda a produção aquícola (OSTRENSKY *et al.*, 2000). A tilápia, *Oreochromis niloticus*, é uma espécie amplamente produzida no Brasil, onde tem grande aceitabilidade devido às suas características zootécnicas, como adaptabilidade em diversas condições de cultivo e boa qualidade de carne. Mesmo sendo uma espécie rústica, a tilápia necessita de um ambiente favorável sem a presença de fatores nocivos ao seu desenvolvimento.

A magnitude desses fatores na piscicultura tem motivado a intensa pesquisa dos processos envolvidos nesta atividade. A qualidade da água é de grande relevância, uma vez que o sucesso desta atividade está diretamente relacionado com o ambiente de criação.

O meio aquático está constantemente exposto a vários produtos tóxicos, entre eles o Mercúrio (Hg). Este elemento é classificado como metal pesado e considerado um dos mais tóxicos dentre os metais liberados no meio ambiente (DENTON e BURDON, 1986; BUHL, 1997). O mercúrio é utilizado em indústrias elétricas, de cloro e soda cáustica, em reatores nucleares, consultórios odontológicos, mineração de ouro e em produtos antifúngicos e farmacêuticos (MOORE, 2000). Alguns trabalhos relatam casos onde foram detectados altos níveis de mercúrio na água, principalmente nas regiões próximas à extração de ouro (SANTOS *et al.*, 2000; MAURICE-BOURGOIN *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001) ou de cidades industriais (KIME, 1998; SUNDERLAND e CHMURA, 2000), onde ocorre uma maior liberação deste metal. Conseqüentemente, a aquicultura se encontra vulnerável a este poluente, uma vez que utiliza no seu sistema de produção a água proveniente de rios, represas ou fontes que possivelmente podem estar contaminadas com Hg.

Peixes contaminados com Hg sofrem alterações patológicas com conseqüente inibição dos processos metabólicos, alterações sangüíneas e diminuição da fertilidade e da sobrevivência (MICRAYAKOV e LAPIROVA, 1997).

O teste de toxicidade aguda, é utilizado para detectar e avaliar a capacidade do agente tóxico em produzir efeitos deletérios em organismos vivos (CETESB, 1999). Os resultados deste tipo de teste acusam a concentração do agente tóxico que proporciona 50% de mortalidade (CL_{50} = Concentração Letal Média) nos organismos em um determinado tempo de exposição.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a toxicidade aguda (CL_{50-96h}) em alevinos de tilápia, ***Oreochromis niloticus***, variedade tailandesa expostos ao mercúrio, em sistema semi-estático, pretendendo-se estabelecer uma referência nos critérios da qualidade da água, a fim de proteger a vida aquática e a produtividade aquícola.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca – SP, em ambiente climatizado (fotoperíodo 10L:14E e temperatura da água $24,40 \pm 2,25$ °C).

Os peixes utilizados foram tilápias sexualmente revertidas ($\cong 100\%$ macho), *Oreochromis niloticus*, de linhagem “Tailandesa”, com peso médio $0,41 \pm 0,12$ g e comprimento médio $2,46 \pm 0,21$ cm, adquiridos de uma piscicultura comercial. O período de aclimação foi de 96 horas, em dois tanques com capacidade para 250 litros cada e preenchidos com água previamente decolorada. Neste período, os alevinos foram alimentados com ração comercial e ficaram em observação a fim de se verificar possíveis variáveis que pudessem interferir no experimento. Após este período, os peixes foram mantidos em jejum e transferidos para aquários de 50 litros e aclimatados novamente, por 48 horas, mantendo-se as mesmas condições de bioensaio (local x densidade). Ao final desta segunda aclimação, os alevinos foram transferidos para aquários com capacidade para 5 L de água, com sistema de aeração artificial e revestidos internamente com sacos plásticos transparentes. A densidade foi de 10 peixes por aquário ($0,8 \text{ g/peixe.L}^{-1}$) e o sistema utilizado foi o semi-estático, onde a água era substituída a cada 24 horas. O período total do teste de toxicidade agudo foi de 96 horas. (APHA *et al.*, 1989).

O produto químico utilizado foi o cloreto de mercúrio 99% (HgCl_2) do laboratório Synth®. O produto em forma de sal foi diluído na proporção de 0,5 g em 1000 ml de água, resultando em uma solução concentrada de mercúrio ($370 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$) denominada de Solução Estoque. As 5 concentrações testadas (concentrações tóxicas determinadas nos testes preliminares) foram preparadas acrescentando-se a quantidade da solução padrão diretamente nos aquários, resultando nas seguintes concentrações de Hg: 0,037; 0,185; 0,370; 0,740; $0,925 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$. Um aquário foi mantido sem a adição do Hg, como grupo controle. Esta bateria, com 5 concentrações diferentes foi realizada em três repetições simultâneas (Figura 1).



Figura 1. Estrutura dos aquários utilizados no teste de toxicidade aguda para alevinos de *O. niloticus*, variedade tailandesa, expostos ao Hg, São Paulo, 2003

A cada 24 horas a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da água foi aferida com termômetro de mercúrio, os valores de pH obtidos com pHmetro e a condutividade elétrica (μScm^{-1}) por condutivímetro. Ao final do experimento foram determinadas a dureza total, pelo método de titulometria, a alcalinidade total (mgCaCO_3) por acidimetria e amônia total (mgL^{-1}) por colorimetria.

As mortalidades foram registradas nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao produto. Os alevinos mortos foram retirados regularmente das soluções testes.

Com os dados das mortalidades obtidas ao final da experimentação foi realizada a análise estatística através do método Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977), determinando-se a concentração letal média ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$).

Foi calculada a concentrações biologicamente segura multiplicando-se o valor da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ por 0,1 e/ou 0,01 (SPRAGUE, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis físicas (Tabela 1) e químicas (Tabela 2) utilizadas no teste de toxicidade aguda para alevinos de tilápia, não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos durante o período de bioensaio. Ocorreu apenas variação nos valores de amônia porém a proporção de amônia não ionizada (tóxica) ficou abaixo dos níveis de toxicidade para peixes (NOGA, 1995).

Tabela 1 – Variáveis físicas da água no teste de toxicidade aguda em Tilápia (*O. niloticus*), variedade tailandesa, exposto ao Hg. São Paulo, 2003

Concentrações de Hg mg.L ⁻¹	pH	Condutividade (μS/cm)	Temperatura da água (°C)
Controle	7,53 ± 0,35	74,13 ± 2,52	24,40 ± 2,25
0,037	7,55 ± 0,36	73,75 ± 2,19	24,40 ± 2,25
0,185	7,57 ± 0,35	73,96 ± 2,32	24,40 ± 2,25
0,370	7,58 ± 0,43	73,83 ± 2,20	24,40 ± 2,25
0,740	6,91 ± 0,79	74,12 ± 1,90	24,40 ± 2,25
0,925	6,72 ± 0,89	73,51 ± 1,00	24,40 ± 2,25

Tabela 2 – Variáveis químicas da água no teste de toxicidade aguda em Tilápia (*O. niloticus*), variedade tailandesa, exposto ao Hg. São Paulo, 2003

Concentrações de Hg mg.L ⁻¹	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Amônia total (mg/L ⁻¹)
Controle	24,88 ± 0,00	20,06 ± 1,24	1,27 ± 0,18
0,0370	24,88 ± 0,00	21,5 ± 0,00	1,35 ± 0,28
0,185	24,24 ± 1,10	19,35 ± 0,00	1,31 ± 0,40
0,370	24,24 ± 1,10	19,35 ± 0,00	1,30 ± 0,03
0,740	24,88 ± 0,00	20,78 ± 1,24	2,11 ± 0,82
0,925	24,88 ± 0,00	22,21 ± 1,24	2,43 ± 0,19

Nos organismos vivos os compostos de mercúrio possuem atração pelo grupamento sulfidrílico e se ligam às proteínas e às enzimas. Em mamíferos estes compostos possuem a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica promovendo alterações nos neurônios ganglionares (GRAEME e POLLACK, 1998). O Hg inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (CLARKSON, 1972), e deprime a atividade das Ca^{2+} -ATPases aumentando a velocidade de liberação de Ca^{2+} e, conseqüentemente, reduzindo sua captação (REDDY *et al.*, 1988). Em humanos, a exposição ao Hg tem dado origem a reações psicóticas como por exemplo: mudança comportamental, irritabilidade, tremores anormais, reflexos exagerados e sinais de polineuropatias (VASSALO *et al.*, 1996).

Os sinais clínicos de intoxicação da tilápia por mercúrio foram percebidos nas primeiras horas de exposição, principalmente nas concentrações maiores (0,925; 0,740 e 0,370 mg.L^{-1} Hg), onde os peixes apresentaram hiperatividade, escurecimento corporal, agressividade e dispnéia seguida de morte. Este comportamento também foi verificado em alevinos de tilápia por CUVIN-ARALAR (1991) em várias concentrações de Hg mais baixas (0,0005 a 0,06 mg.L^{-1} Hg) que as do presente trabalho. AL-AKEL e SHAMSI (1988), testando concentrações mais altas (5 a 20 mg.L^{-1} Hg) em alevinos de tilápia, observaram o mesmo comportamento, além de salto sobre a superfície da água.

Com relação a outras espécies, comportamentos semelhantes também foram verificados. HIRT e DOMITROVIC (1999), relataram que exemplares de *Aequidens portalegrensis* expostos às concentrações 0,20; 0,36; 0,64; 1,12 e 2,00 mg.L^{-1} de HgCl_2 manifestaram os seguintes sinais nas primeiras horas do bioensaio: nado errático, perda de equilíbrio, tentativa de respiração na superfície da água, escurecimento de pele e hipersecreção mucosa, especialmente nas concentrações mais elevadas. Na concentração intermediária, esses autores observaram perda de equilíbrio, elevação para a superfície e diminuição da motilidade e, na menor concentração, os movimentos natatórios eram mais lentos, com maior motilidade das nadadeiras peitorais. GAIKWAD (1989), testando a toxicidade aguda de mercúrio, cobre e selênio em *Etilapia maculatus*, observou que a

toxicidade pelo mercúrio resultou em nado letárgico e aumento dos movimentos branquiais. Segundo PANIGRAHI e MISRA (1978), *Anabatas scandens* exposta ao nitrato de mercúrio na concentração de 3 mg.L⁻¹ manifestou inapetência e ataxia nos primeiros cinco dias de exposição. Depois de 3 semanas à exposição, notou-se sinais de cegueira e diminuição na atividade respiratória.

Os resultados de mortalidades para as tilápias expostas a diferentes concentrações de Hg por 96 horas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Porcentagem cumulativa e média de mortalidade em tilápia tailandesa, *O. niloticus* em função do tempo, no teste de toxicidade aguda com Hg, nas três repetições, São Paulo, 2003

TEMPO (Horas)														

Verificou-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes intoxicados pelo Hg elevou-se à medida que as doses e o tempo de exposição aumentaram.

Nas duas concentrações mais altas (0,74 e 0,925 mg.l⁻¹Hg), a taxa de mortalidade foi de 100% nas primeiras 24 horas de ensaio, comprovando-se assim, a alta toxicidade destas concentrações. As concentrações mais baixas revelaram menor índice de

mortalidade durante todo o período de experimentação, com exceção da concentração controle, que apresentou em média 20% de mortalidade ao final de 96 horas, sendo que a maior mortalidade foi registrada somente em uma das réplicas. De qualquer forma, segundo KLEMM **et al.** (1994) esta porcentagem de mortalidade no grupo controle é considerada aceitável em testes de toxicidade de curta duração.

Analisando-se estatisticamente esses dados foi possível determinar a concentração letal média (CL_{50-96h}) de 0,196 mg.L⁻¹ Hg para alevinos de tilápia que é apresentada na Tabela 4, juntamente com resultados obtidos por outros autores.

Tabela 4 - Valores de CL_{50-96h} para o Hg em diferentes espécies de peixes

Referência	Espécie	Resultado em mg.L ⁻¹
Presente Trabalho	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,196
CHARUWAN-SOMSIRI (1982)	<i>Oreochromis niloticus</i>	3,710*
RAMAMURTHI et al. (1982)	<i>Tilapia mossambicus</i>	0,739*
BUHL (1997)	<i>Ptychocheilus lucius</i>	0,168
BUHL (1997)	<i>Gila elegans</i>	0,108
BUHL (1997)	<i>Xyrauchen texanus</i>	0,128
DAS et al. (1980)	<i>Heteropneustes fossilis</i>	0,350
HIRT e DOMITROVIC (1999)	<i>Aequidens portalegrensis</i>	0,660
KHANGAROT (1981)	<i>Channa marulius</i>	0,314
KIM (1979)	<i>Cyprinus carpio</i>	0,100
KIM (1979)	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	0,150
NAMMALWAR (1989)	<i>Liza macrolepis</i>	0,360
REHWOLDT et al. (1972)	<i>Cyprinus carpio</i>	0,180
REHWOLDT et al. (1972)	<i>Roccus americanus</i>	0,220
REHWOLDT et al. (1972)	<i>Fundulus diaphanus</i>	0,110
SHYONG e CHEN (2000)	<i>Varicorhinus barbatus</i>	0,168
SHYONG e CHEN (2000)	<i>Zacco barbata</i>	0,161
SLABBERT e VENTER (1999)	<i>Poecilia reticulata</i>	0,200

* 72 horas

O valor de CL_{50-96h} para a tilápia determinada no presente trabalho, apresentou-se inferior aos resultados obtidos por RAMAMURTHI *et al.* (1982) e CHARUWAN-SOMSIRI (1982) que avaliaram a toxicidade aguda de Hg em *Tilapia mossambica* e *Oreochromis niloticus*, respectivamente. Os valores superiores encontrados por estes autores podem ser devidos ao tempo de exposição, uma vez que a CL_{50} foi estabelecida em 72 horas, possibilitando valor de CL_{50} mais alto para estes organismos, quando comparados aos expostos por 96 horas do presente estudo. PARK e KIM (1979) e KHANGAROT (1981), mencionam também que o aumento no tempo de exposição ao produto é proporcional ao índice de mortalidade o que pode proporcionar menor valor da CL_{50} . Além disso, o valor de CL_{50-72h} mencionado por CHARUWAN-SOMSIRI (1982) pode ser maior devido à superioridade no tamanho dos alevinos (3,5 cm) por ele utilizado, pois os organismos aquáticos em geral, apresentam uma maior resistência aos produtos tóxicos com o avanço da idade e tamanho corporal (BOENING, 2000; BUHL, 1997; ALAN e MAUGHAN, 1995).

O valor de CL_{50-96h} estabelecido por RAMAMURTHI *et al.* (1982) pode estar relacionado com a maior dureza da água de cultivo, 35 mg $CaCO_3/L$ enquanto que no presente trabalho a média foi 24,5 mg $CaCO_3/L$. Esses dados confirmam os de RODGERS e BEAMISH (1981) e AMEND (1970), onde citam que o aumento da dureza na água resulta em uma diminuição da toxicidade do Hg no organismo.

Considerando as outras espécies, similarmente pesquisadas, o valor de CL_{50} determinada neste trabalho para a tilápia, encontra-se próximo aos mencionados por REHWOLDT *et al.* (1972), para *Cyprinus carpio* e *Roccus americanus*; por SHYONG e CHEN (2000), para *Varichorhinus barbatus* e *Zacco barbata*; por BUHL (1997), para *Ptychocheilus lucius*; por KIM (1979), para *Misgurnus anguillicaudatus* e por SLABBERT e VENTER (1999), para *Poecilia reticulata*.

Segundo as recomendações de SPRAGUE (1971) foi calculado para proteção da vida aquática, a partir da CL_{50-96h} , o valor da concentração aquática biologicamente segura

do Hg para *Oreochromis niloticus* (0,0019 mg.l⁻¹Hg). O valor estimado neste experimento, é apresentado e comparado (Tabela 5) com alguns padrões nacionais e internacionais de qualidade de água.

Tabela 5 - Concentrações de Hg recomendadas segundo alguns padrões nacionais e internacionais de qualidade de água, São Paulo, 2003

	Hg (mg.L ⁻¹)
Presente trabalho (CL _{50-96h} X 0,01)	0,0019
CONAMA (1986)	0,0002
Malaysia National Water Quality standards (DOE-UM, 1986)	0,0001
Taiwan Water Quality Standards (TAIWAN EPA, 1985)	0,002
Water Quality Standards for Aquaculture (MEADE, 1989)	< 0,02

CONAMA (1986) recomenda a concentração máxima de 0,0002 mg.L⁻¹ Hg para água utilizada na criação (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana. Este valor é muito similar ao recomendado por DOE-UM (1986), contudo ambas as recomendações encontram-se inferiores ao apresentado neste trabalho para a tilápia, evidenciando a confiabilidade na concentração recomendada por estes órgãos.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o mercúrio é altamente tóxico para alevinos de tilápia e, com isso, expressa a importância do risco deste metal ao meio ambiente, pois a contaminação pode representar uma grande ameaça para as populações de peixes e, também, um sério problema para a aquicultura. Entretanto, a concentração máxima de Hg permitida pelo CONAMA (1986) para água destinada ao cultivo de organismos aquáticos, demonstra ser segura para *Oreochromis niloticus*.

REFERÊNCIAS

- AL-AKEL, A.S. e SHAMSI, M.J.K. 1988. *Oreochromis niloticus* (Cichlidae: Perciformes): Behavioural responses imputed by contamination of water HgCl₂ and ZnSO₄. Journal Biological Science Research. 19 (suppl.): 949-956.
- ALAN, J.K. e MAUGHAN, O.E. 1995. Acute toxicity of heavy metals to common carp (*Cyprinus carpio*). Journal Environmental Science Health Part A: Environmental Science Eng. Toxic. Hazard subst. Control., A30 (8): 1807-1816.
- AMEND, D.F. 1970. Retention of mercury by salmon. Prog. Fish. Cult., 32: 192-194.
- APHA; AWWA; WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater, 17 ed. Washington, D.C: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation.
- BENNETT, B.M. 1952. Estimation of LD₅₀ by moving averages. J Hyg 50: 157-164.
- BOENING, D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: A General Review Chemosphere, 40: 1335-1351.
- BUHL, K.J. 1997. Relative sensitivity of three endangered fishes, Colorado Squawfish, Bonytail, and Razorback Sucker, to selected metal pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 37: 186-192.
- CETESB. 1999. Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP. 1:149 p.
- CLARKSON, T.W. 1972. The pharmacology of mercury compounds. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 12: 375-406

- CHARUWAN-SOMSIRI. 1982. Acute toxicity of mercury, copper and zinc to the Nile tilapia (*Tilapia nilotica*, Linnaeus, 1757). Thailand Fisheries Gazette, 35(3): 313-318.
- CONAMA. 1986. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo: 11.356.
- CUVIN-ARALAR, M.L.A. 1991. Acute toxicity of mercury to *Oreochromis niloticus* fingerlings. In: Symposium on Inland Aquatic Environmental Stress Monitoring. Bogor. Indonésia. SEAMEO-BIOTROP, 43: 133-137.
- DAS, K.K.; DASTIDAR, S.G.; CHAKRABARTY, S. e BANERJEE, S.K. 1980. Toxicity of mercury: a comparative study in air-breathing fish and non air-breathing fish. Hydrobiologia, 68: 225-229.
- DENTON, G.R.W. e BURDON, J.C. 1986. Environmental effects on toxicity of heavy metals to two species of tropical marine fish from Northern Australia. Chemosphere Ecology, 2 (3): 233-249.
- DOE-UM. 1986. Water quality criteria and standards for Malaysia. Executive Summary. Final Report. Department of Environment, Ministry of Science, Technology and Environment, Malaysia/Consultant group on water quality, Institute of Advanced Studies, Univ. of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 1: V-XII.
- DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J. e LUCOTTE, M. 2001. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. The Science of the Total Environment, 271: 87-97.
- FINNEY, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, 138 p.
- GAIKWAD, S. A. 1989. Acute toxicity of mercury, copper and selenium to the fish *Etroplus maculatus*. Environmental Ecology, 7 (3): 694-696.

- GRAEME, K.A. e POLLACK, C.V.Jr. 1998. Heavy metal toxicity, Part I: Arsenic and Merucury. The Journal of Emergency Medicine, 16 (1): 45-56.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C. e THURSTON, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ Sci. Tecnhol, 11: 714-719.
- HIRT, L.M. e DOMITROVIC, H.A. 1999. Toxicidad y respuesta hitopatológica en ***Aequidens portalegrensis*** (Pisces, Cichlidae) expuestos a bicloruro de mercúrio en ensayos de toxicidad aguda y subletales. Reunión de comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes,Tomo IV (Ciências Veterinárias), 4: 19-22.
- KHANGAROT, B.S. 1981. Effect of zinc, copper and mercury on ***Channa marulius*** (Hamilton). Acta Hydrochim. Hydrobiol., 9 (6): 639-649.
- KIM, J.M. 1979. The toxicity of mercury and cadmium on two freshwater fishes, carp and loach. Bulletin Kordi, 1 (1): 15-21.
- KIME, D.E. 1998. Endocrine disruption in fish. University of Sheffield. Kluwer Academic Publishers. 383 p.
- KLEMM, D.J.; MORRISON, G.E.; NORBER-KING, T.J.; PELTIER, W.H. e HEBER, M.A. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluentes and receiving waters to marine and estuare organisms. 2nd ed. EPA-600/4-91-003, Environmental monitoring and Support Lab, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J. e COURAU, P. 2000. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira Rivers and mercury exposure in Riparian Amazonian populations. The Science of the Total Environment, 260: 73-86.
- MEADE, J.W. 1989. Aquaculture management. Van Nostrand Reinhold, New York.

- MICRYAKOV, V.R. e LAPIROVA, T.B. 1997. Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in juvenile ***Acipenser baeri***. Journal of Ichthyology, 37 (6): 458-462.
- MOORE, C.J. 2000. A review of mercury in the environment (Its occurrence in marine fish). South Carolina Marine Resources Division Technical Report, 88: 1-15.
- NAMMALWAR, P. 1989. Biochemical changes resulting from bioassay of heavy metals mercury and cadmium to the grey mullet ***Liza macrolepis*** (Smith). Program of the First International Marine Biotechnology Conference IMBC: 47.
- NOGA, E.J. 1995. Fish Disease: Diagnosis and treatment. Mosby-Year Book. St. Louis, Missouri, USA. 367p.
- OSTRENSKY, J.O.; BORGHETTI, J.R e PEDINI, M. 2000. Situação atual da aquicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A; BORGHETTI, J.B. Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia. p. 354-381.
- PANIGRAHI, A.K. e MISRA, B.N. 1978. Toxicological effects of mercury on a freshwater fish, ***Anabas scandens***, Environmental Pollutant, 16 (1): 31-39.
- PARK, J.S. e KIM, H.G. 1979. Acute toxicity test of mercury, copper and cadmium to yellowtail, ***Seriola quinqueradiata*** and rock bream, ***Oplegnathus fasciatus***. Bull. Korean Fish. Soc., 12 (2): 119-123.
- RAMAMURTHI, R.; NAIDU, K.A.; SUBBIAH, M.B.; BALAJI, N. e RAO, M.V.R. 1982. Toxicity of mercury to some freshwater organisms. Geobios Jodhpur, 9: 89-90.
- REDDY, R.S.; JINNA, R.R.; UZODINMA, J.E.; DESAIAH, D. 1988. In vitro effect of mercury and cadmium on brain Ca^{2+} -ATPase of the catfish ***Ictalurus punctatus***. Bull Environ Contam Toxicol, 41: 324-8.

- REHWOLDT, R.; MENAPACE, L.W.; NERRIE, B. e ALESSANDRELLO, D. 1972. The effect of increased temperature upon the acute toxicity of some heavy metal ions. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 8: 91-96.
- RODGERS, D.W. e BEAMISH, F.W.H. 1981. Effects of water hardness, inorganic mercury and zinc on uptake of waterborne methylmercury in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Annual Aquatic Toxicity Workshop, Guelph, Ontário, Ottawa, Environment Canada, 8: 197-199.
- SANTOS, L.S.N.; MÜLLER, R.C.S.; SARKIS, J.E.S.; ALVES, C.N.; BRABO, E.S.; SANTOS, E.O. e BENTES, M.H.S. 2000. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós river basin, Pará, Brazil. The Science of the Total Environment, 261: 1-8.
- SHYONG, W.-J. e CHEN, H.-C. 2000. Acute toxicity of copper, cadmium, and mercury to the freshwater fish *Varicorhinus barbatulus* and *Zacco barbata*. Acta Zoologica Taiwanica. 11 (1): 33-45.
- SLABBERT, J.L. e VENTER, E. A. 1999. Biological assays for aquatic toxicity testing. Wat. Sci. Tech, 39 (10-11): 367-373.
- SPRAGUE, J.B. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and safe concentrations. Water Res., 3: 793-821.
- STEPHAN, C.E. 1977. Methods for calculating an LC₅₀. In: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM STP 634, Philadelphia, p. 65-84.
- SUNDERLAND, E. M. e CHMURA, G.L. 2000. An inventory of historical mercury emissions in Maritime Canada: Implications for present and future contamination. The Science of the Total Environment, 256: 39-57.

TAIWAN EPA. 1985. Water quality standards. Environmental protection agency, Taipei, Taiwan, 547327.

VASSALLO D. V.; MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E.M.; ROSSONI, L.V.; AMARAL, S.M.C. e VASSALLO, P.F. 1996. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 67(1).

Capítulo 2

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TILÁPIA “TAILANDESA”, *Oreochromis niloticus* EXPOSTA AS CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE MERCÚRIO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de conhecer as alterações hematológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus*, variedade tailandesa, exposta a diferentes concentrações de mercúrio (Hg) na água e avaliar a concentração de Hg recomendada pelo CONAMA (1986) para as águas destinadas ao cultivo de peixes. O teste foi conduzido no laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca – SP, em ambiente climatizado. Juvenis de tilápia com peso médio de $27,13 \pm 4,67$ g e comprimento médio de $12,44 \pm 0,84$ cm, foram expostos às seguintes concentrações: 0,02; 0,002 e 0,0002 mg.L⁻¹ Hg (CONAMA, 1986). Foi montada uma bateria com 3 réplicas de cada concentração e mais o grupo controle. As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal. O experimento foi conduzido por 14 dias, com amostras de sangue de 2 indivíduos por aquário, avaliados aos 3, 7, 10 e 14 dias. Dentre as diferentes características do sangue avaliaram-se: as contagens globais de eritrócitos (Er), leucócitos (Lc) e trombócitos (Tr), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), contagem diferencial dos leucócitos e índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). Os resultados demonstraram que as concentrações de Hg testadas, não alteraram significativamente os parâmetros hematológicos, permitindo concluir que a quantidade de Hg na água não foi suficiente para afetar o quadro hematológico de *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

The hematology of “Tailand” tilapia, *Oreochromis niloticus* was investigated after long-term (14 days) exposure of various Hg concentrations. The challenge was conducted in the Toxicology Laboratory – Instituto de Pesca, SP, with constant temperature. The methods used were those recommended by APHA *et al.* (1986) and the tests performed with alevins (mean length of 12.44±0.84 cm and mean weight of 27.13±4.67 g). The fish were kept in twelve 5-liter glass aquaria filled with dechlorinated water plus the following mercury concentrations: (control, 0.02, 0.002, 0.0002 mg.L⁻¹Hg) during 14 days. The group was set up with three replicates of each concentration and more the group control. Blood samples were collected from 2 individuals of each concentration at 0, 3, 7, 10 and 14 days of exposure. The hematological variables analysed were: total red blood cell count (Er), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), total (Lc) and differential leucocytes count and total thrombocytes count (Tr). There was no significant differences between the hematological means in the different Hg concentrations. It was possible to conclude that the Hg concentrations utilized were not enough to promote visible blood alterations.

INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes contendo mercúrio (Hg) no ambiente, tem provocado graves problemas de contaminação nas comunidades de vários ecossistemas e em populações humanas (CASTRO, 1991). Casos como os de Minamata e Niigata, no Japão, nas décadas de 50 e 60, e no Iraque, em 70, refletem o alto risco desta poluição. Com isso, vem despertando a atenção de autoridades sanitárias em relação à contaminação de águas dos rios por despejos industriais contendo mercúrio porque, além de ser o mais tóxico dos metais pesados, é também cumulativo em animais por longo período de tempo (DUARTE, 1977).

Os organismos aquáticos produzidos em sistemas de criação (Aqüicultura) estão constantemente expostos aos poluentes, uma vez que utiliza-se em seu processo de produção a água proveniente de rios, lagos ou fontes que pode estar contaminada com Hg. Segundo TAVARES (1995), para que ocorra um bom desenvolvimento e sobrevivência dos organismos aquáticos, é de fundamental importância as condições do meio em que vivem. A introdução de qualquer substância na água acarreta alterações na sua qualidade, as quais nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos organismos aquáticos.

O teste de toxicidade aquática é um procedimento no qual as respostas dos organismos são usadas para detectar a presença ou medir o efeito de uma ou mais substâncias, resíduos ou fatores ambientais. Estes testes são utilizados para avaliar a poluição do corpo de água quando os testes químicos e físicos não são suficientes para avaliar os potenciais efeitos sobre a biota aquática (GOLTEIN, 1983). Com esta finalidade, para o ambiente aquático, têm sido desenvolvidos testes com peixes, micro-crustáceos, algas e bactérias (CETESB, 1999).

De acordo com OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (1996), estudos de toxicidade utilizando peixes em condições controladas permitem, através de avaliações da mortalidade,

alterações de comportamento, alterações hematológicas e danos nos tecidos, obter informações importantes correspondentes aos efeitos dos poluentes na biota de um ecossistema aquático natural.

O estudo de diferentes constituintes bioquímicos e celulares do sangue é de fundamental importância na avaliação fisiológica e fisiopatológica dos animais, pois pode ocorrer variação morfológica e quantitativa dos elementos sangüíneos frente às modificações induzidas por poluentes e outros fatores ambientais (KAVAMOTO *et al.*, 1983; JUNEJA e MAHAJAN, 1983; RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985; RANZANI-PAIVA et al, 1997). Segundo NUSSEY *et al.* (1995), o estudo do quadro hematológico é freqüentemente utilizado para detectar alterações fisiopatológicas nas diferentes condições de estresse como, por exemplo, na exposição a metais pesados.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de se estudar as possíveis alterações hematológicas em tilápia, *Oreochromis niloticus*, exposta a diferentes concentrações de mercúrio. Paralelamente, foi testada a concentração (0,0002 mg.L⁻¹Hg), recomendada pelo CONAMA (1986), para águas de criação de espécies destinadas à alimentação humana.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca – SP, em ambiente climatizado (fotoperíodo 10L:14E e temperatura da água $25,3 \pm 1,06$ °C).

Os peixes utilizados foram tilápias sexualmente revertidas ($\cong 100\%$ machos), *Oreochromis niloticus* de linhagem “Tailandesa”, com peso médio de $27,13 \pm 4,67$ g e comprimento médio de $12,44 \pm 0,84$ cm, adquiridos de uma piscicultura comercial. O período de aclimação foi de 96 horas em tanque de alvenaria, com capacidade para 2500 litros cada. Neste período os peixes foram alimentados com ração comercial e ficaram em observação a fim de determinar possíveis variações que pudessem intervir no experimento. Após este período, os peixes foram transferidos para tanques de 250 litros e aclimatados novamente, por 48 horas, mantendo-se as mesmas condições de bioensaio (local x densidade). Ao final desta segunda aclimação, os peixes foram transferidos para aquários com capacidade para 40 litros de água com sistema de aeração artificial e revestidos internamente com sacos plásticos transparentes.

O produto químico empregado foi o Cloreto de Mercúrio 99% (HgCl_2) em forma de sal, do laboratório Synth[®]. O sal foi diluído na proporção de 0,1354 g em 1000 mL de água, resultando na solução 1 ($100 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$). A partir desta solução foram retirados 100 ml que adicionados em 900 ml de água, originou a solução concentrada denominada de solução estoque ($10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$). Esta solução foi pipetada e diluída diretamente nos aquários em quantidades suficientes para proporcionar as seguintes concentrações de mercúrio na água: 0,02; 0,002 e 0,0002 $\text{mg.L}^{-1} \text{ Hg}$, que foram estimadas a partir da $\text{CL}_{50-96\text{h}}/10$, $\text{CL}_{50-96\text{h}}/100$ e $\text{CL}_{50-96\text{h}}/1000$ (Capítulo 1) sendo, esta última, coincidente com a recomendada pelo CONAMA (1986). Um aquário foi mantido sem a adição do Hg, como grupo controle. Esta bateria, com as 3 concentrações diferentes e o controle foram realizadas em três repetições simultâneas (Figura 1).



Figura 1. Estrutura dos aquários utilizados nos testes de toxicidade crônica em *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta ao Hg São Paulo, 2003

O tempo de exposição ao mercúrio foi de 14 dias e a densidade foi de 16 peixes por aquário.

Para as análises hematológicas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína e o sangue coletado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis, previamente heparinizadas (Figura 2). No início do experimento, coletou-se sangue de 6 indivíduos antes da distribuição dos peixes nos aquários, sendo caracterizados como tempo zero. Posteriormente, coletou-se sangue de 2 indivíduos por aquário, nos intervalos 3, 7, 10 e 14 dias de exposição. A partir das amostras de sangue foram obtidas as seguintes contagens globais: de eritrócitos (Er) corados de acordo com NATT & HERRICK (1952) e contados em câmara de Neubauer; hematócrito (Ht) pela técnica do microhematócrito segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); taxa de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina segundo COLLIER (1944); índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), segundo WINTROBE (1934); leucócitos totais (Lc), contagem total de trombócitos (Tr) segundo a metodologia recomendada por HRUBE e

SMITH (1998) e contagem diferencial de leucócitos em extensões sangüíneas coradas pelo método de ROSENFELD (1947).

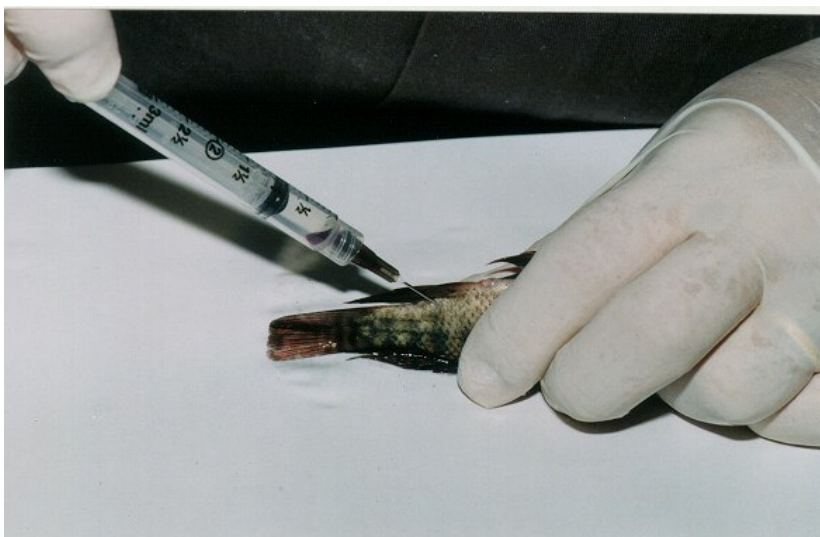


Figura 2. Colheita de sangue por punção caudal em *O. niloticus*, variedade tailandesa, São Paulo, 2003

Os peixes foram alimentados com ração extrusada logo após cada período de coletas seguida de sifonagem do excedente e de excretas, com posterior reposição de 1/3 da água por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.

A cada 24 horas a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da água foi aferida com termômetro de mercúrio, os valores de pH obtidos com pHmetro e a condutividade elétrica (μScm^{-1}) por condutímetro. Ao final do experimento foram determinadas a dureza total, pelo método de titulometria, a alcalinidade total (mgCaCO_3) por acidimetria e amônia total (mgL^{-1}) por colorimetria.

A água utilizada nesta experimentação, com exceção dos controles, foi armazenada e tratada antes de ser desprezada para o sistema de esgoto urbano. Para isto, foi adicionado o Hidróxido de Sódio até a solução atingir o pH entre 9 e 10. Posteriormente, foi adicionada uma solução contendo Sulfeto de Sódio, o qual resultou na cristalização do Hg e conseqüente sedimentação do produto químico. A água foi desprezada e o sedimento

recolhido e encaminhado ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) de Piracicaba para a sua reciclagem final.

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos à análise de variância, através do procedimento GLM do SAS[®] (1989), e a diferença entre as médias dos tratamentos, comparada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis físicas e químicas da água utilizadas no teste de toxicidade crônica para a tilápia (Tabelas 1 e 2), não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados entre os tratamentos. Apesar do alto nível de amônia total, os cálculos realizados segundo NOGA (1995), a quantidade de amônia não ionizada (tóxica) apresentou a média de 0,08 mg.L⁻¹ de NH₃. HARGREAVES e KUCUK (2001), mencionam que concentrações de NH₃ abaixo de 0,28 mg.L⁻¹ não resultam em alterações significativas para *Oreochromis aureus*.

Tabela 1 – Variáveis físicas da água no teste de toxicidade crônica em *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta ao Hg, São Paulo, 2003

Concentrações de Hg mg.L ⁻¹	pH	Condutividade (μS/cm)	Temperatura (°C)
Controle	6,78 ± 0,25	133,19 ± 39,88	25,29 ± 1,10
0,02	7,03 ± 1,02	118,16 ± 31,29	25,10 ± 1,12
0,002	7,06 ± 0,72	133,28 ± 40,38	25,35 ± 1,01
0,0002	6,89 ± 0,39	140,58 ± 47,73	25,48 ± 1,02

Tabela 2 – Variáveis químicas da água no teste de toxicidade crônica em *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta ao Hg, São Paulo, 2003

Concentrações de Hg mg.L ⁻¹	Dureza (CaCO ₃ mg/L)	Alcalinidade (CaCO ₃ mg/L)	Amônia (mg.L ⁻¹)
Controle	29,98 ± 2,92	62,35 ± 7,44	14,90 ± 0,71
0,02	28,71 ± 0,00	50,16 ± 3,28	11,30 ± 1,09
0,002	26,79 ± 1,91	63,06 ± 4,96	15,21 ± 1,82
0,0002	28,07 ± 1,10	56,61 ± 6,91	15,81 ± 0,55

Os resultados obtidos para as diferentes características hematológicas de ***Oreochromis niloticus*** exposto às diferentes concentrações de Hg não diferiram significativamente em relação às concentrações testadas ao final dos 14 dias. Porém, quando comparados isoladamente nos tempos de coletas alguns tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Os resultados obtidos para as características eritrocíticas estão apresentados no Apêndice 1 e na Figura 3.

Analisando os dados obtidos, nota-se que a diminuição observada nos valores médios do Ht é devida à redução de Er circulantes, como refletido nos valores de VCM, principalmente na concentração mais alta (0,02 mg.L⁻¹Hg). Nesta concentração percebe-se claramente no gráfico dois picos, um no terceiro e outro no décimo dia de exposição. Esses valores foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes daqueles apresentados por animais do controle.

Os valores médios de Hb no sangue total variaram entre 4 e 6,2 g/dL, com maior diferença na concentração de 0,0002 mg.L⁻¹, em relação ao controle. Verificando-se a quantidade de Hb (HCM) e sua concentração (CHCM) nos eritrócitos, notou-se leve ascensão de seus valores médios ao longo do experimento, sendo sugestivo de pequeno aumento do volume dos eritrócitos e da quantidade de hemoglobina dentro deles.

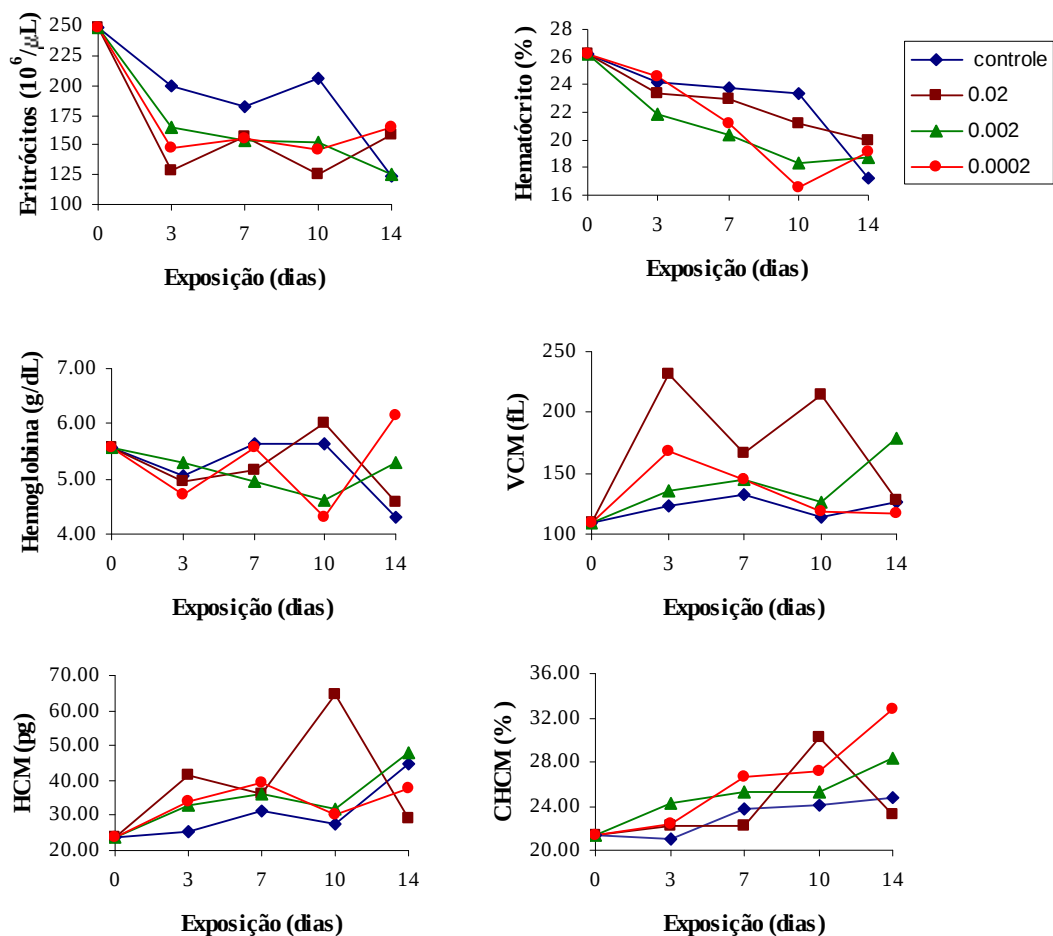


Figura 3. Variação dos valores médios obtidos para as características eritrocíticas em tilápia, *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hg, nos diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003

As variações dos valores médios da série vermelha observadas na figura 3, demonstraram diminuição dos valores de ER e Ht. SHAKOORI *et al.* (1994), estudando *Ctenopharyngodon idella* exposto ao HgCl₂ (0,0005 mg.L⁻¹ Hg), observou a diminuição de ER, Ht e da taxa de Hb nas primeiras duas semanas de experimentação e posterior aumento de VCM na quarta semana de exposição. Resultados semelhantes foram mencionados por BEENA e VISWARANJAN (1987) e HILMY *et al.* (1980) para *Cyprinus carpio* e *Aphanius díspar*, respectivamente. FLETCHER e WHITE (1986) relacionam estas alterações com o processo de esplenomegalia observada em testes de toxicidade com

HgCl₂ em *Pleuronectes platessa*, pois o baço é um importante órgão fagocitário com afinidade pelos eritrócitos e de acordo com seus resultados, a diminuição de Ht coincide com o aumento na massa deste órgão. O'CONNOR e FROMM (1975) relacionam a diminuição de Er e Ht com o processo de hemólise das hemácias em consequência da toxicidade do Hg. Por outro lado, alguns autores afirmam que a diminuição na taxa do Ht neste tipo de experimentação pode estar relacionada com o processo de confinamento ou ao estresse induzido pela falta de comida (BENFEY e BIRON, 2000 e AFFONSO *et al*, 2002).

Resultados diferentes e divergentes podem ocorrer devido a vários fatores como, por exemplo, a diferença de tamanho corporal, diferença de espécie, concentração do produto e o tempo de exposição (FLETCHER e WHITE, 1986). Em experimentos similares realizados com *Channa punctatus* (JUNEJA e MAHAJAN, 1983) e truta arco-íris (O'CONNOR e FROMM, 1975), foi notado aumento do número de Er e Ht. Estes últimos autores observaram no início do experimento, queda de Ht e ao final de 12 semanas, constatou o oposto. O autor menciona a possibilidade de que tenha ocorrido estimulação dos tecidos eritropoiéticos em resposta à diminuição de Er ocasionados pela hemólise de eritrócitos em consequência à exposição ao Hg. Além disso, OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (2000) relatam que peixes expostos ao Hg inorgânico dissolvido na água apresentam processo de hipóxia, determinado pela hiperplasia celular nas lamelas secundárias das brânquias, diminuindo a superfície de troca gasosa. Em resposta à dificuldade respiratória, o organismo estimula o aumento de Er, Hb e CHCM como mecanismo para aumentar o carreamento de oxigênio (AFFONSO *et al.*, 2002) correlacionando, assim, as alterações sangüíneas como um fator secundário da lesão do mercúrio nas brânquias dos peixes.

O número total de trombócitos apresentou tendência a aumentar ao final do décimo quarto dia de exposição ao metal. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, que comprovasse o efeito das concentrações testadas (Figura 4)

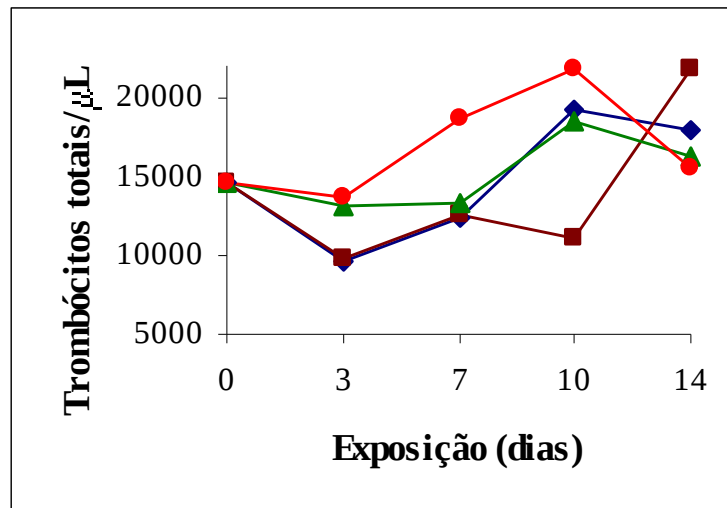


Figura 4. Valores médios do número total de trombócitos de tilápia, *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hg em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003

Os leucócitos encontrados no sangue periférico de *O. niloticus* foram: linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Figura 5). Os resultados da contagem diferencial de leucócitos estão apresentados no Apêndice 2 e na Figura 6.

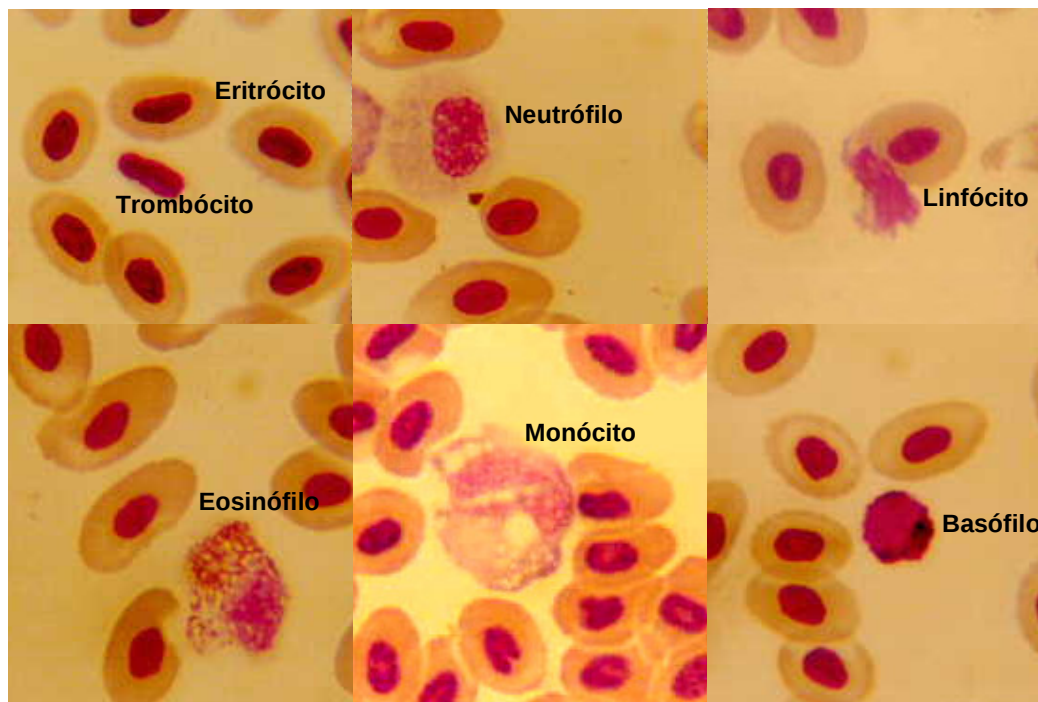


Figura 5. Células sangüíneas observadas em tilápia, *O. niloticus*, variedade tailandesa Rosenfeld. 1000 x

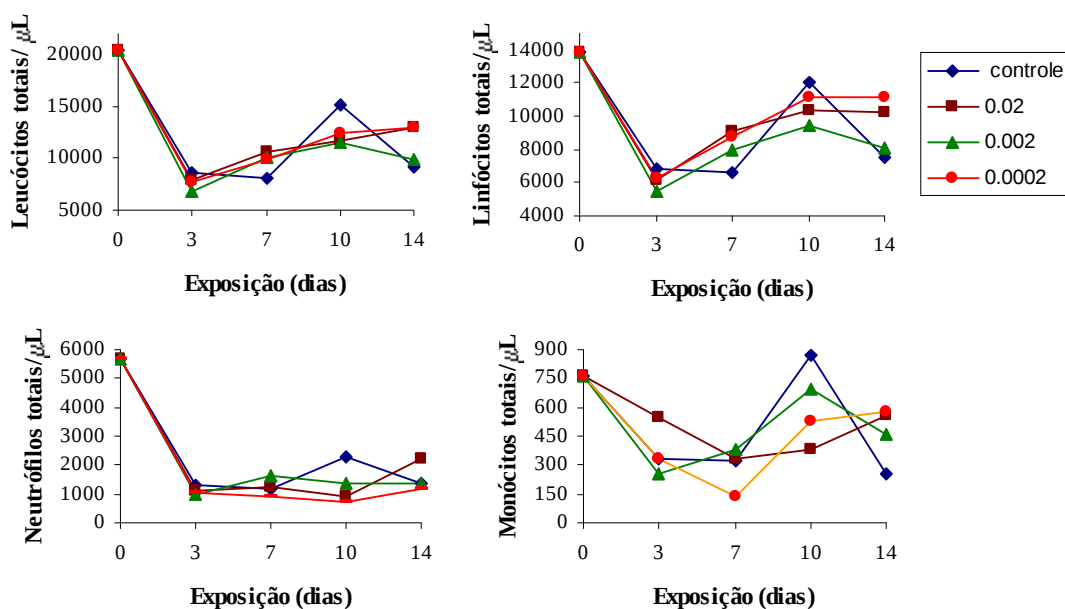


Figura 6. Variação dos valores médios obtidos para os números absolutos de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos em sangue periférico de tilápia, *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta a varias concentrações de Hg, nos diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003

Os resultados apresentados na figura 6 demonstram marcante diminuição no número total de leucócitos (Lc) em todos os tratamentos, inclusive nos animais controle. Esta diminuição é resultante da linfopenia e neutropenia ocorridas nos primeiros três dias de exposição, inclusive nos controles. Posteriormente, observa-se estabilização até o final do décimo quarto dia de experimentação. MISRA e BEHERA (1992) depararam com os mesmos resultados em teste de toxicidade com *Channa punctatus* expostos ao HgCl_2 (0,25 mg.L^{-1}). GILL e PANT (1985) atribuem esta alteração ao fator estresse de experimento que também é demonstrado em vários vertebrados. Segundo BENFEY e BIRON (2000), *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis* submetidos ao estresse de confinamento e manipulação apresentaram diminuição de Lc, linfócitos e ligeiro aumento do número total de trombócitos. Esses autores mencionam a hipótese de que o estresse leva a uma redistribuição dos linfócitos, principalmente aos órgãos linfóides (timo e rim anterior),

diminuindo na circulação sangüínea, ou a destruição dos linfócitos em resposta ao alto nível de cortisol.

O número médio de monócitos apresentou tendência a diminuir no início e a aumentar no final da experimentação, porém sem diferença significativa entre os tratamentos.

Basófilos e eosinófilos foram encontrados em poucos peixes, razão pela qual não foi possível visualizar os possíveis efeitos do Hg sobre essas células.

Com os resultados obtidos no presente trabalho relativos ao hemograma percebeu-se que as alterações sangüíneas não foram afetadas significativamente pelo mercúrio. DAWSON (1990), testando Hg em *Scophthalmus aquosus* em concentrações (0,0005 e 0,01mg.L⁻¹ Hg) semelhantes às utilizadas no presente trabalho, observou os mesmos resultados. Supõe-se, então, que essas duas espécies são resistentes aos efeitos tóxicos do Hg nestas concentrações e mais vulneráveis ao estresse.

As concentrações de mercúrio foram estimadas a partir dos resultados do teste de toxicidade aguda em alevinos (0,41 ± 0,12 g) de tilápia, padronizada segundo normas de APHA **et al.** (1989). No presente trabalho foram utilizados juvenis (27,13 ± 4,67 g) da mesma espécie, sendo este o tamanho adequado para proporcionar a quantidade de sangue necessária para as análises. Vários autores enfatizam que a sensibilidade ao mercúrio em organismos aquáticos é maior em indivíduos jovens e de menor tamanho corporal (BOENING, 2000; BUHL, 1997; ALAN e MAUGHAN, 1995). Acredita-se, então, que as concentrações testadas não foram suficientes para alterar os parâmetros sangüíneos de *Oreochromis niloticus*, sendo necessário a utilização de concentrações mais altas ou de maior tempo de exposição em futuras pesquisas.

CONCLUSÕES

Nas concentrações utilizadas neste experimento as variáveis sangüíneas estudadas não demonstraram alterações significativas decorrentes da toxicidade do mercúrio (HgCl_2) na água. No entanto, a concentração recomendada pelo CONAMA (1986) é considerada segura para a criação de *Oreochromis niloticus*.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G. e RANTIN, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish ***Colossoma macropomum*** exposed to sulfide or hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 133: 375-382.
- APHA; AWWA; WPCF. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 17 ed. Washington, D.C: APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation.
- ALAN, J.K. e MAUGHAN, O.E. 1995. Acute toxicity of heavy metals to common carp (***Cyprinus carpio***). Journal Environmental Science Health Part A: Environmental Science Eng. Toxic. Hazard subst. Control., A30 (8): 1807-1816.
- BENNA. S. e VISWARANJAN, S. 1987. Effect of cadmium and mercury on the hematological parameter of the fish ***Cyprinus carpio***. Environ. Ecol., 5 (4): 726-732.
- BENFEY, T.J. e BIRON, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (***Oncorhynchus mykiss***) and brook trout (***Salvelinus fontinalis***). Aquaculture, 184: 167-176.
- BOENING, D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review Chemosphere, 40: 1335-1351.
- BUHL, K.J. 1997. Relative sensitivity of three endangered fishes, Colorado Squawfish, Bonytail, and Razorback Sucker, to selected metal pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 37: 186-192.
- CASTRO, A.C.L. 1991. Quantificação de mercúrio total em tecido muscular do dourado (***Salminus maxillosus*** Valenciennes, 1849) do rio Mogi-Guaçu – SP. São Carlos, SP. 82 p. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

- CETESB. 1999. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Volume 1. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP. 149 p.
- CONAMA. 1986. Resolução Nº 20, de 18 de Junho de 1986. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. D.O.U. Executivo 30/07/86: 11 – 356.
- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. Can. Med. Ass. J., Toronto, 50: 550-2.
- DAWSON, M.A. 1990. Blood chemistry of the windowpane flounder ***Scophthalmu aquosus*** in Long Island sound: geographical, seasonal, and experimetal varitations. Fishery Bulletin, 88 (3): 429-437.
- DUARTE, R.G. 1977. Detecção de mercúrio em tecidos de peixes por espectrofotometria de absorção atômica. São Paulo, SP. 76 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo.
- FLETCHER, T.C. e WHITE, A. 1986. Nephrotoxic and haematological effects of mercuric chloride in the plaice (***Pleuronectes platessa***). Aquatic Toxicology, 8: 77-84.
- GILL, T.S. e PANT, J.C. 1985. Mercury-induced blood anomalies in the freshwater teleost, ***Barbus conchoni***. Water Air and Soil Pollution., 24 (2): 165-171.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Amer. J. Clin. Path., Philadelphia, 56 (1): 59-9.
- GOLTEIN, E.G. 1983. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de E.R.Q. – Suzano, através de ensaios biológicos. Revista DAE., São Paulo, 132: 42-47.

- HARGREAVES, J.A. e KUCUK, S. 2001. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. *Aquaculture*, 195: 163-181.
- HILMY, A.M.; SHABANA, M.B. e SAID, M.M. 1980. Haematological responses to mercury toxicity in the marine teleost, ***Aphanius dispar*** (RÜPP). *Comp. Biochem. Physiol.*, 67C: 147-158.
- HRUBEC, T.C. e SMITH, S.A. 1998. Hematology of fish. *In: Schalm's Veterinary Hematology*. 5a. Ed., 1120-1125.
- JUNEJA, C.J. e MAHAJAN, C.L. 1983. Hematological and haemopoietic changes in fish *Channa punctatus* due to mercury pollution in water. *Indian J. Anim. Res.*, 17 (2): 63-71.
- KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. e TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” ***Rhamdia hilarii*** (Val. 1840), Teleosteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 10 (único): 53 – 60.
- MISRA, S.K. e BEHERA, S.C. 1992. Evaluation of toxic effects of mercuric chloride on hematological parameters of a freshwater fish ***Channa punctatus*** (Bloch). *Environ. Ecol.*, 10 (2): 394-396.
- NATT, M.P. e HERRICK, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci.*, Ontário, 31 (1): 735 - 738.
- NOGA, E.J. 1995. *Fish Disease: Diagnosis and treatment*. Mosby-Year Book. St. Louis, Missouri, USA., 367p.
- NUSSEY, J.H.J.; VAN-VUREN; DU-PREEZ, H.H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, ***Oreochromis mossambicus*** (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, (3): 369-380.

- O'CONNOR, D.V e FROMM, P.O. 1975. The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of Rainbow trout. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology., 13 (4): 406-411.
- 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; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C. e ROULEAU. 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. Environmental Research Section A., 83: 286-292.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1985. Estudos hematológicos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. Boletim do Instituto de Pesca., 12 (2): 25 – 35.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.-S. e EIRAS, A.C. 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. Revta Bras. Zool., 14 (2): 329-339.
- ROSENFELD, G. 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Men. Inst. Butantan, 20: 315-328.
- SAS .1989. This manual is as follows: SAS Institute Inc., SAS/STAT® User's. Guide, Version 8.2, Fourth Edition, Volume 1, Cary, Nc: SAS Institute Inc., 943 pp.
- SHAKOORI, A.R.; IQBAL, M.J.; MUGHAL, A.L. e ALI, S.S. 1994. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Journal Ecotoxicol. Environ. Monit., 4 (2): 81-92.

TAVARES, L.H.S. 1995. Limnologia Aplicada à Aqüicultura. Boletim Técnico 1. Jaboticabal, SP. 72p.

WINTROBE, M.M. 1934. Variation in the science and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. Folia Haematologica, 51: 32-49.

Apêndice

Apêndice 1 – Média e desvio padrão das análises sangüíneas da série vermelha de tilápias, *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta às várias concentrações de Hg em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003

Tempo de exposição	Tratamentos	Eritrócitos	Hematócrito	Hemoglobina	VCM	HCM	CHCM	N
	mg. L ⁻¹ Hg	(10 ⁴ /μL)	(%)	(g/dL)	(fL)	(pg)	(%)	
0 dias	Basal	247,0 ± 17,8	26,8 ± 1,7	5,6 ± 0,4	109,0 ± 4,3	23,5 ± 3,0	21,4 ± 2,2	6
	Controle	200,2 ± 13,3	24,2 ± 0,4	5,1 ± 0,3	123,3 ± 7,6	25,6 ± 2,0	20,9 ± 1,5	2
3 dias	0,02	128,8 ± 25,8	23,4 ± 1,6	5,0 ± 0,6	230,9 ± 59,6	41,7 ± 5,8	22,3 ± 3,4	2
	0,002	164,2 ± 14,6	21,8 ± 1,3	5,3 ± 0,3	134,9 ± 5,2	32,7 ± 1,5	24,2 ± 0,5	2
	0,0002	147,8 ± 24,4	22,0 ± 2,7	4,7 ± 0,5	160,9 ± 26,8	34,0 ± 3,3	22,4 ± 2,0	2
7 dias	Controle	181,8 ± 10,1	23,0 ± 1,5	5,6 ± 0,4	130,9 ± 5,6	31,0 ± 2,0	23,7 ± 0,9	2
	0,02	156,4 ± 32,2	22,9 ± 1,7	5,2 ± 0,6	166,0 ± 20,1	36,3 ± 4,6	22,2 ± 1,4	2
	0,002	153,7 ± 25,6	20,3 ± 2,4	4,9 ± 0,5	145,4 ± 26,2	36,0 ± 7,8	24,4 ± 0,9	2
	0,0002	155,2 ± 20,0	21,2 ± 1,5	5,6 ± 0,4	145,1 ± 16,6	39,6 ± 17,4	26,7 ± 2,4	2
	Controle	205,5 ± 8,9	23,4 ± 0,6	5,6 ± 0,2	114,4 ± 2,2	27,6 ± 1,7	24,1 ± 1,0	2
10 dias	0,02	124,6 ± 26,5	21,2 ± 2,7	6,0 ± 0,4	214,6 ± 50,5	64,7 ± 17,4	30,2 ± 3,1	2
	0,002	151,9 ± 27,6	18,3 ± 2,8	4,6 ± 0,7	126,3 ± 10,1	31,8 ± 2,9	25,2 ± 1,2	2
	0,0002	145,1 ± 18,2	16,5 ± 1,7	4,3 ± 0,5	118,0 ± 11,3	30,2 ± 6,7	27,1 ± 4,4	2
	Controle	124,3 ± 22,1	17,3 ± 0,7	4,3 ± 0,2	183,7 ± 58,4	44,8 ± 13,7	24,8 ± 0,7	2
14 dias	0,02	157,6 ± 6,9	20,0 ± 1,4	4,6 ± 0,3	127,6 ± 8,9	29,3 ± 2,5	23,2 ± 1,5	2
	0,002	124,8 ± 20,8	18,7 ± 0,6	5,3 ± 0,6	179,4 ± 37,8	47,9 ± 8,0	28,3 ± 3,0	2
	0,0002	164,8 ± 17,2	19,2 ± 2,1	6,1 ± 0,4	116,6 ± 6,9	38,0 ± 2,1	32,8 ± 1,8	2

Apêndice 2 - Média e desvio padrão das contagens globais e diferenciais de leucócitos de tilápia, *O. niloticus*, variedade tailandesa, exposta a várias concentrações de Hq em diferentes momentos de coleta, São Paulo, 2003

Tempo de exposição	Tratamentos mg. L ⁻¹ Hg	Linfócitos Número/μL	Neutrófilos Número/μL	Monócitos Número/μL	Leucócito total Número/μL	N
0 dias	Basal	13882,6 ± 2024,2	5690,6 ± 1160,7	763,6 ± 349,2	20360 ± 3316	6
	Controle	6866,7 ± 982,2	1320,1 ± 192,6	329,9 ± 99,0	8541 ± 1223	2
3 dias	0,02	6202,0 ± 1191,9	1121,8 ± 320,3	547,7 ± 116,8	6519 ± 1069	2
	0,002	5502,3 ± 1050,6	998,3 ± 336,1	251,3 ± 76,1	6764 ± 1650	2
	0,0002	6241,7 ± 1065,6	1042,3 ± 398,5	330,9 ± 114,8	7641 ± 1650	2
	Controle	6559,6 ± 1006,0	1159,0 ± 272,7	326,0 ± 84,6	8044 ± 1096	2
7 dias	0,02	9076,2 ± 2821,5	1242 ± 594,1	329,3 ± 104,8	10904 ± 3760	2
	0,002	8003,4 ± 1129,1	1622,5 ± 699,1	379,4 ± 114,8	10023 ± 1494	2
	0,0002	8792,3 ± 1963,4	903,1 ± 77,2	140,7 ± 26,4	9845 ± 2342	2
	Controle	12033,6 ± 993,4	2277,0 ± 410,8	672,1 ± 229,2	15182 ± 937	2
10 dias	0,02	10370,4 ± 1859,7	918,9 ± 133,9	377,6 ± 94,9	12021 ± 2486	2
	0,002	9438,2 ± 2050,2	1362,6 ± 465,3	690,5 ± 216,0	11491 ± 2921	2
	0,0002	11183 ± 1482,7	691,2 ± 235,1	531,0 ± 210,1	12440 ± 2159	2
	Controle	7501,8 ± 1423,6	1391,6 ± 294,6	259,1 ± 60,0	9163 ± 2016	2
14 dias	0,02	10204 ± 1402,6	2232,6 ± 722,6	557,3 ± 159,0	10409 ± 1943	2
	0,002	8089,6 ± 1008,7	1340,0 ± 258,8	457,1 ± 131,0	9925 ± 1359	2
	0,0002	11121,4 ± 2348,0	1194,9 ± 214,0	573,9 ± 173,9	12971 ± 2982	2

N = Número de exemplares