

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

**EFEITO DO SELÊNIO SOBRE A TOXICIDADE DO
CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) EM TILÁPIA, *Oreochromis
niloticus* (LINNAEUS, 1757)**

Jakeline Galvão de França

Jaboticabal –SP

maio/2005

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

**EFEITO DO SELÊNIO SOBRE A TOXICIDADE DO
CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂) EM TILÁPIA, *Oreochromis
niloticus* (LINNAEUS, 1757)**

Jakeline Galvão de França

Orientadora Prof^a Dr^a Maria José T. Ranzani Paiva

Co-Orientador Dr. Júlio Vicente Lombardi

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

Jaboticabal –SP

maio/2005

DEDICATÓRIA

*Dedico esta obra,
a minha Mãe
e ao amor da minha vida
Alexandre
pelo grande apoio e incentivo*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a professora, pesquisadora e orientadora Dra. Maria José T. Ranzani Paiva e ao pesquisador e co-orientador Dr. Júlio V. Lombardi, pelo carinho, paciência, ensinamentos e pela amizade, sendo estes de grande valor.

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

Aos colegas Nilton M. Ishikawa (Paraca), Adriano Gonçalves e Flávia M. Andreguetto pela amizade, pelos momentos divertidos e pela grande ajuda durante a realização deste trabalho.

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

Ao pesquisador José Roberto Ferreira pela amizade e pelo apoio prestado.

Aos estagiários do Instituto de Pesca de São Paulo: Silmara, Robson, Dani, Fernanda, Elma e Thaise, pela grande ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesca de São Paulo, por tornar possível a realização deste estudo.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio creditado no Projeto 00/14460-3.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

As pisciculturas Aquabel e Águas Claras pelo fornecimento dos peixes.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract.....	2
1- Introdução.....	3
2- Revisão Bibliográfica.....	6
3- Objetivo.....	15
4- Material e Métodos.....	16
4.1- Descrição Geral	16
4.2- Condução dos Bioensaios	16
4.3- Teste de Toxicidade Aguda.....	18
4.4- Teste de Toxicidade Crônica.....	20
5- Resultados	23
5.1- Toxicidade Aguda	23
5.2- Toxicidade Crônica	25
6- Discussão.....	29
7- Conclusões	35
8- Referências Bibliográficas..	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em <i>Oreochromis niloticus</i> exposta ao Hg e ao Se.....	23
Tabela 2 - Variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em <i>Oreochromis niloticus</i> exposta ao Hg e ao Se.....	23
Tabela 3 - Mortalidade média acumulativa (%) em tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda com Hg e Se	24
Tabela 4 - Variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica em <i>Oreochromis niloticus</i> exposta ao Hg e ao Se	25
Tabela 5 - Variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica em <i>Oreochromis niloticus</i> exposta ao Hg e ao Se	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo do Mercúrio no ambiente	8
Figura 2 - Alevino de tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> , utilizado no experimento de toxicidade aguda com Hg e Se	18
Figura 3 - (a) Vista da bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade aguda com Hg e Se, (b) sistema de aeração artificial utilizado durante o experimento de toxicidade aguda com Hg e Se.....	19
Figura 4 - Jovem de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> , utilizada no experimento de toxicidade crônica com Hg e Se	20
Figura 5 - Aquários utilizados para o teste de toxicidade crônica realizado com tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> contaminada com Hg e Se	21
Figura 6 - Coleta de sangue por punção caudal em jovem de <i>Oreochromis niloticus</i>	22
Figura 7 - Variação dos valores médios dos parâmetros hematológicos de tilápia, <i>O. niloticus</i> , exposta as concentrações de mercúrio, selenito e selenato de sódio, nos diferentes momentos de coleta	27
Figura 8 - Variação dos valores médios dos índices hematimétricos de tilápia, <i>O. niloticus</i> , exposta as concentrações de mercúrio, selenito e selenato de sódio, nos diferentes momentos de coleta	28

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar se as duas formas de selênio (selenito de sódio – Se^{4+} e selenato de sódio- Se^{6+}) têm efeito antagônico à ação tóxica do cloreto de mercúrio (HgCl_2) através da toxicidade aguda (96h) e crônica (14 dias), utilizando a tilápia, *Oreochromis niloticus* como organismo teste. Para os dois tipos de testes os tratamentos consistiram na seguinte composição: **I**) grupo controle; **II**) somente Hg; **III**) somente Se^{4+} ; **IV**) somente Se^{6+} ; **V**) Se^{4+} + Hg e **VI**) Se^{6+} + Hg. Para o teste de toxicidade aguda, foram utilizados alevinos submetidos à concentração de $0,4 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ (considerada concentração letal média – CL_{50}) e à concentração de $1,0 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$ (considerada concentração de efeito letal não observado – CELNO) para o selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e o selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$). O teste de toxicidade crônica foi conduzido por 14 dias com a utilização de jovens de tilápia expostos às seguintes concentrações: $0,08 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0,4 \text{ mg Se}^{4+} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,4 \text{ mg Se}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$. A avaliação dos efeitos crônicos sub-letais foi realizada através dos parâmetros hematológicos: número de eritrócitos (Er), taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). No teste de toxicidade aguda não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) nos índices de mortalidade observados entre os tratamentos de mercúrio e nas associações (Hg + Se^{4+} e Hg + Se^{6+}). Nas análises hematológicas verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) para CHCM da concentração de associação do mercúrio + selenato de sódio (Hg + Se^{6+}) no décimo dia de coleta. Os resultados demonstraram que as duas formas de selênio utilizadas no teste agudo não foram eficientes para minimizar os efeitos tóxicos do mercúrio. No teste de toxicidade crônica o tratamento de associação mercúrio + selenato de sódio provocou alterações no sangue da tilápia.

ABSTRACT

This work had as objective to evaluate if the two forms of selenium (sodium selenite – Se^{4+} and sodium selenate – Se^{6+}) have antagonistic effect to the toxic action of mercury chloride (HgCl_2) through the acute toxicity (96h) and chronic (14 days), using the tilapia, *Oreochromis niloticus*. For the two types of tests the treatments had consisted of: **I**) control group; **II**) only Hg; **III**) only Se^{4+} ; **IV**) only Se^{6+} ; **V**) Se^{4+} + Hg and **VI**) Se^{6+} + Hg. For the test of acute toxicity, was used juveniles submitted to the concentration of $0.4 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ (considered mean lethal concentration - CL_{50}) and in the concentration of $1.0 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$ (considered concentration of non observed effect of lethality - NOEL) for the sodium selenite ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) and the sodium selenate ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$). The test period of chronic toxicity was 14 days with young tilapia in the following concentrations: $0.08 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.4 \text{ mg Se}^{4+} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.4 \text{ mg Se}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$. The evaluation of the sub-lethal chronic effect had been carried through the hematological parameters: erythrocyte count (Er), hemoglobin level (Hb), hematocrit (Ht) and for the hematimetric indices (MCV, MCH and MCHC). In the test of acute toxicity significant difference ($P > 0.05$) in the mortality indices between the mercury treatments and in the associations did not occurs (Hg + Se^{4+} and Hg + Se^{6+}). In the hematological analyses significant difference ($P < 0.05$) for MCHC of the concentration of association of mercury + selenate of sodium (Hg + Se^{6+}) in the tenth day was verified. The results had demonstrated that the two used forms of selenium in the acute test were not efficient to minimize the mercury toxicity. In the test of chronic toxicity the treatment of association mercury + selenate of sodium provoked alterations in the blood of the tilapia.

1- INTRODUÇÃO

Entre as substâncias tóxicas que chegam aos ecossistemas aquáticos, os metais pesados merecem atenção especial devido à sua ação residual (baixa biodegradabilidade) e principalmente pelo seu efeito acumulativo na cadeia trófica (PEÁLEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2002).

A concentração de metais pesados em ecossistemas aquáticos e a sua concomitante aquisição pelos organismos que vivem neste ambiente estão aumentando, devido ao crescimento populacional e à intensificação de atividades antropogênicas, ameaçando não somente a biota aquática, mas também os organismos que dependem dela para sua nutrição, reprodução e sobrevivência (HUNN *et al.*, 1987).

Os efeitos dos metais pesados nos ecossistemas aquáticos se caracterizam por uma discreta redução nas taxas de crescimento e de reprodução, aumento da taxa de mortalidade e até a eliminação completa da biota (MAZON *et al.*, 2002).

Conseqüentemente, a aqüicultura se encontra vulnerável aos poluentes, uma vez que utiliza no seu sistema de produção água proveniente de rios, represas ou fontes que possivelmente possam estar contaminadas com mercúrio. Em anos recentes, tem crescido a atenção do efeito do mercúrio sobre a saúde dos peixes. Este aspecto é de grande importância para o desenvolvimento de pesqueiros que muitas vezes estão localizados em águas sujeitas à industrialização, a práticas agrícolas ou de mineração (ALLEN, 1994).

Segundo HAMILTON (2004), pequenas quantidades de selênio são necessárias para o crescimento e desenvolvimento normal dos organismos; concentrações moderadas podem ser estocadas e utilizadas na manutenção das funções homeostáticas e em quantidades elevadas podem resultar em efeitos tóxicos.

Muitas pesquisas têm sido direcionadas ao estudo da poluição aquática, mas as conseqüências de interações simultâneas entre dois ou mais poluentes no mesmo organismo aquático ainda são pouco conhecidas.

De acordo com RAND e PETROCELLI (1985) os testes de toxicidade com organismos aquáticos realizados em laboratórios permitem avaliar os efeitos de agentes tóxicos que podem provocar alterações na água e prejudicar os organismos ali existentes, sendo os testes de toxicidade aguda e crônica os mais utilizados.

Para avaliar as alterações provocadas nos peixes pela contaminação ambiental são frequentemente realizados estudos com sangue e órgãos dos animais expostos aos contaminantes em doses sub-letais. O estudo do sangue facilita a detecção de alterações patológicas no organismo e ajuda a identificar a extensão e a natureza dos desvios das condições normais (STOROZHUK e GULEVA, 1983).

Segundo OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (2000), através das alterações hematológicas é possível obter informações importantes correspondentes aos efeitos causados na biota de determinado ecossistema, em ambiente natural.

Vários autores enfatizam que o conhecimento das anormalidades existentes no sangue constitui um meio auxiliar muito valioso e seguro na avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos peixes (KAVAMOTO *et al.*, 1983, RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1985, RIBEIRO *et al.*, 1999, TAVARES-DIAS e MORAES, 2004, RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Poucos estudos foram realizados sobre a interação entre mercúrio e selênio no sangue de organismos aquáticos, sendo o primeiro realizado por KAI *et al.* (1988) em duas espécies de atum, *Thunnus albacares* e *T. obesus*, onde observaram a relação concentração molar entre selênio e o mercúrio total no sangue destes organismos. Já, estudos referentes a esses metais separados são mais abundantes. Neste sentido, DAWSON (1990) determinou leve aumento no hematócrito e diminuição na taxa de hemoglobina em *Scophthalmus aquosus* submetido a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio. MICRYAKOV e LAPIROVA (1997) relataram que a intoxicação por cloreto de mercúrio causou diminuição do conteúdo de hemoglobina e no

número de leucócitos no esturjão, *Acipenser baeri*. GONÇALVES (2004) verificou que o selenito de sódio provoca alterações no sangue de tilápia, produzindo anemia com linfocitose. Entretanto, ISHIKAWA (2004), também utilizando tilápia em testes de toxicidade com Hg, não verificou alterações sanguíneas que pudessem ser atribuídas à ação tóxica deste metal.

A tilápia apresenta grande potencial industrial, devido a suas características zootécnicas e a alta qualidade de sua carne e por apresentar boa aceitação pelo mercado consumidor. Atualmente é explorada em 22 Estados do Brasil, exceção feita apenas para alguns Estados da Região Norte (OSTRENSKY *et al.*, 2000).

A aquicultura depende dos ecossistemas aquáticos, já que grande parte de suas criações são dependentes de rios e lagos, conseqüentemente a contaminação por mercúrio e selênio nestes ambientes torna-se uma ameaça para a aquicultura. Por este motivo e devido à escassez de literatura específica sobre o assunto este estudo buscou avaliar o efeito do mercúrio e da sua associação ao selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e ao selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$) para a tilápia, *Oreochromis niloticus*, espécie que tem sido intensamente utilizada na piscicultura mundial e está hoje entre as espécies mais indicadas para o cultivo intensivo nas regiões tropicais.

Este estudo foi baseado em trabalhos anteriores desenvolvidos por ISHIKAWA (2003) e GONÇALVES (2004), que determinaram as $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ e as alterações hematológicas induzidas pelo Hg e Se, separadamente e fazem parte do projeto “Considerações Biogeoquímicas e Ecotoxicológicas relativas ao Mercúrio e ao Selênio, presentes nas Represas de Barra Bonita e Bariri, São Paulo, SP”, desenvolvido pelo Instituto de Pesca de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP, no processo n°. 00/14460-3.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A aquicultura atual, como uma atividade economicamente emergente, encontra-se inteiramente dependente dos ecossistemas nos quais está inserida. 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.

O sucesso da piscicultura está associado ao ambiente favorável livre de fatores nocivos que possam acarretar danos aos animais, comprometendo a produção. Os fatores que podem prejudicar a piscicultura são cada vez mais alvos de estudos, com a finalidade de se obter maior conhecimento sobre essa atividade.

Os agentes tóxicos entram nos ecossistemas aquáticos através da contaminação da água do lençol freático e da drenagem urbana, ou pela descarga de efluentes domésticos e industriais (DAMATO, 2000). Segundo este mesmo autor, a toxicidade é a propriedade relativa de uma determinada substância química que se refere ao seu potencial de causar efeitos danosos a uma população de seres vivos. Ela é função da concentração da substância química e do tempo de exposição. A emissão antropogênica representa a principal fonte de vestígio de elementos tóxicos no meio ambiente.

Diferentes formas de poluição e suas causas são indicativos da importância da preservação dos recursos hídricos, de modo que possam ser utilizados para o consumo, para recreação e que possam garantir a vida dos organismos aquáticos (TURNER, 1990). Esses aspectos impõem que a concentração, os efeitos e o comportamento desses poluentes possam ser previstos (TURNER, 1990; STUMM e MORGAN, 1981). Dentre essas espécies químicas, metais pesados como Hg e Se, são de grande importância nos ecossistemas aquáticos (NRIAGU e PACYNA, 1988).

Após os acidentes de Minamata e Niigata, no Japão, durante as décadas de 1950 e 1960, o uso do Hg e seus efeitos sobre o ambiente tornaram-se uma preocupação (EYSINK *et al.*, 1988). Dessa forma, foram estabelecidos limites de ocorrência para este metal, que para compartimentos de ecossistemas aquáticos, situam-se entre $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ para água e $1,0\mu\text{g/g}$ para sedimento (JARDIM, 1988). De acordo com as normas do CONAMA (1986), o limite máximo de mercúrio aceito para água utilizada na criação natural ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana, é de $0,0002\text{ mg.L}^{-1}$ Hg.

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 (CASTRO, 1991). Segundo NRIAGU e PACYNA (1988), a emissão artificial de Hg mundial tem representado uma das principais fontes deste metal pesado liberado em lagoas e rios. Além das indústrias, a mineração de ouro e a extração do mercúrio representam outras formas importantes de liberação e contaminação das águas, atingindo várias populações como, por exemplo, as que se alimentam de peixes da bacia Amazônica e do pantanal mato-grossense brasileiro (SOUZA e BARBOSA, 2000; PORVARI, 1995; BOURGOIN *et al.*, 2000 e HYLANDER *et al.*, 2000).

O mercúrio é distinto em duas classes de compostos: inorgânicos, na forma metálica ou elementar (Hg^0), mercúrio I (Hg^2) e mercúrio II (Hg), estados nos quais o átomo de mercúrio perde um e dois elétrons, respectivamente; e orgânicos: o mercúrio é ligado ao átomo de carbono de um grupo metil, etil ou propil (WHO, 1989).

Nesta biotransformação o metal é encontrado no sedimento (lodo) sob a forma de Hg^+ em equilíbrio com a forma Hg^{2+} . Na forma Hg^+ sofre ação bacteriana sendo convertido em mercúrio metálico, que é pouco volátil e permanece no sedimento ou em metilmercúrio, que é altamente

tóxico e se acumula na cadeia alimentar. Esta transformação do íon mercúrio em metilmercúrio se faz por intermédio de processos metabólicos com a participação da vitamina B₁₂. As bactérias permitem a transferência do grupamento metil da vitamina B₁₂ ao mercúrio, formando dimetilmercúrio, que abandonando o sedimento é convertido sob a ação dos raios ultravioleta em metano, etano e mercúrio metálico, o qual retorna ao sedimento (Figura 1).

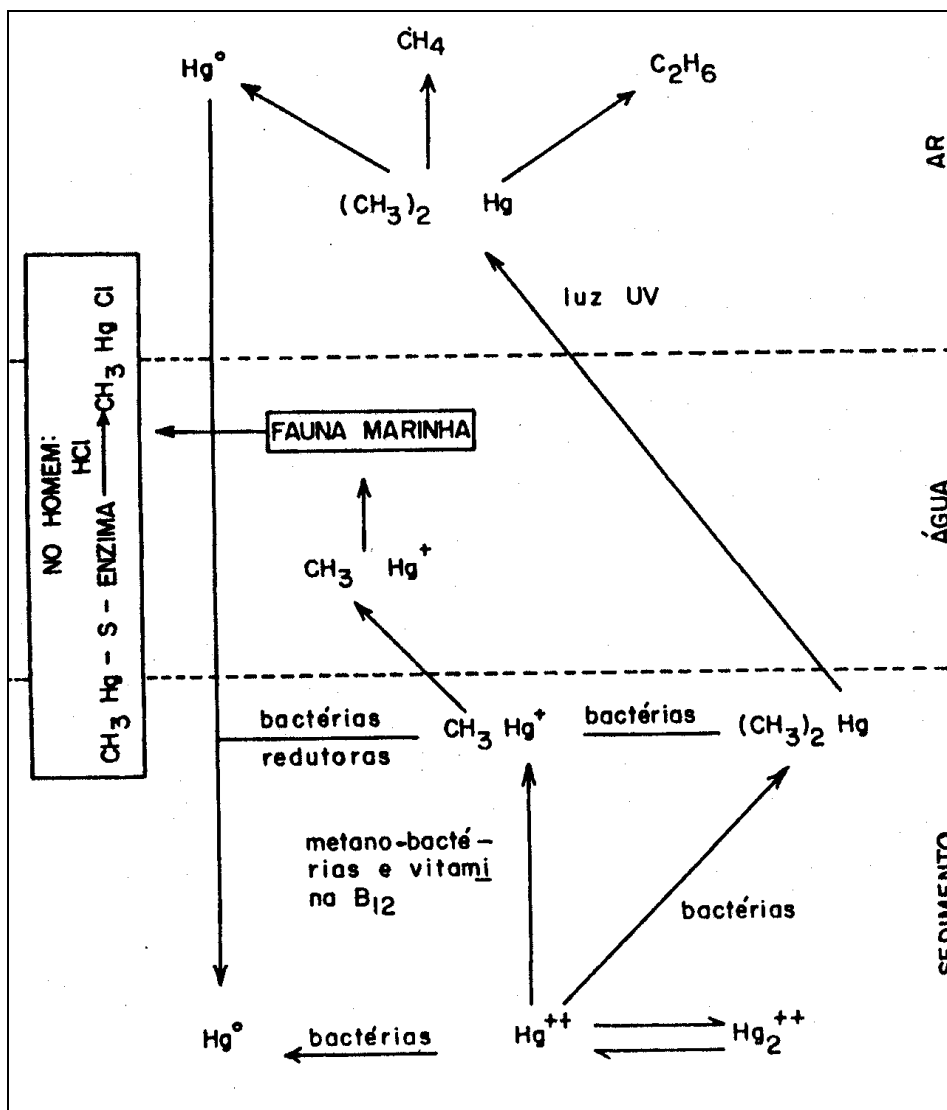


Figura 1-Ciclo do Mercúrio no ambiente

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 aqüicultura, pois grande parte desta atividade é dependente da água dos rios e lagoas.

Uma vez presente na água, as formas lipossolúveis de Hg apresentam afinidade pelos grupos sulfidrilas das proteínas, atravessando as membranas celulares dos organismos vivos e incorporando-se às células e, conseqüentemente, às cadeias tróficas (CETESB, 1986).

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). O conteúdo de Hg nos peixes é particularmente importante, porque este é o primeiro caminho da contaminação do homem que os consome (GRAY *et al.*, 2000). A quantidade acumulada nos peixes depende da quantidade ingerida de alimento contaminado, da idade, do tamanho e, principalmente, do seu nível trófico, ocorrendo acúmulo maior de mercúrio em peixes carnívoros (HOLSBEEK *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, quantidade de matéria orgânica e temperatura determinam a bioacumulação desse metal pesado nos ecossistemas e nos peixes. O tempo de exposição e a taxa de metabolismo ou eliminação do tecido também influenciam nesse processo (OLSON *et al.* 1978).

A influência do pH na bioacumulação foi demonstrada por WREN e MACCRIMMON, (1983) em peixes coletados no centro-sul de Ontário. A taxa de crescimento e a concentração de mercúrio total foram determinadas em tecido muscular de *Lepomis gibbosus*. A média do pH da água variou entre 5,6 e 8,4. A taxa de crescimento foi relacionada positivamente com o pH do lago, enquanto o nível de mercúrio no peixe foi mais alto em pH baixo, mostrando que a redução no pH aumenta a absorção de mercúrio pelo peixe. A dureza da água também influencia a toxicidade do mercúrio, RODGERS e BEAMISH (1981) demonstraram que a absorção de metilmercúrio por trutas foi menor com dureza da água de 385 mg CaCO₃/L do que com 30 mg CaCO₃/L.

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, redução da fecundidade e da taxa de sobrevivência e alteração da capacidade de defesa celular e humoral (MIKRYAKOV e LAPIROVA, 1997). A intoxicação resulta em severos danos branquiais, hepáticos e renais (PANDEY *et al.*, 1996 e BANO e HASAN, 1990).

O selênio é um micro nutriente essencial em animais (EISLER, 2000), que desempenha papel importante nos sistemas biológicos e seu caráter tóxico depende da concentração, absorção e biodisponibilidade (DÍAZ *et al.*, 1996). Ocorre nos estados de oxidação -2, 0, +4 e +6. Este último, conhecido como selenato, é a forma de maior interesse em poluição ambiental. Os compostos nos quais o selênio apresenta-se no estado de oxidação +4, conhecido como selenito, são os de menor solubilidade, diminuindo a disponibilidade deste elemento para a biota. Agentes moderadamente redutores como o SO₂ e o ácido ascórbico convertem o selenito em selênio. O selênio, quando ligado com metais pesados, principalmente mercúrio, torna-se muito insolúvel, podendo ser este o maior mecanismo de detoxificação do mercúrio pelo selênio presente na dieta (NAS, 1976). Nos organismos, sua forma química será dependente tanto da quantidade fornecida, quanto da forma do elemento ingerido e de sua associação com as proteínas nos tecidos animais e vegetais (UNDERWOOD, 1971). Sua biodisponibilidade será influenciada pela presença de microorganismos nos solos e sedimentos (BRINCKMAN e IVERSON, 1975).

O selênio é liberado na água em seu meio natural através da dissolução ou oxidação de rochas e sais solúveis e estes processos são controlados por fatores biológicos e microbiológicos (DÍAZ *et al.*, 1996). Segundo WATANABE e SATOH (1997), os minerais são essenciais para os processos da vida e os peixes os retiram da água para sua alimentação e para manter as atividades

metabólicas das células e tecidos. O selênio em baixos níveis é benéfico para as funções metabólicas, como a síntese da glutathione peroxidase (GUNBY, 1981), e atua como antioxidante intracelular, na prevenção da peroxidação de lipídios das membranas celulares dos eritrócitos e de outras células contra danos provocados pelos radicais livres (STADTMAN, 1980). Nos peixes, grande parte do selênio é absorvida pela membrana branquial e pelo intestino, depois é estocado nos tecidos, principalmente no fígado, sob a forma inorgânica (WATANBE e SATOH, 1997; LOW e SIN, 1998).

Este elemento é um metalóide de significância industrial, ambiental, biológica e toxicológica (BISWAS *et al.*, 1997). As indústrias utilizam o selênio para fabricação de vidros, células fotoelétricas, componentes e retificadores, semi-condutores, medicamentos e inseticidas (GERMAN, 1992).

O nível mínimo requerido de selênio para dieta dos peixes encontra-se entre 0,2 e 0,5 mg/kg (STEFFENS, 1989). Para o Se a diferença entre toxicidade e essencialidade ocorre em um intervalo estreito de concentração, sendo esta em função de sua lipossolubilidade (SCHWARZ e PATHAK, 1975), das espécies envolvidas, da via de entrada no organismo e da quantidade ingerida. São recomendados valores máximos de 0,01 mg/L para a manutenção da vida aquática e de 0,05 a 0,25 mg/L para águas destinadas ao abastecimento (DeMAYO *et al.*, 1979).

Assim, como o mercúrio, o selênio também sofre metilação (NAS 1976) e bioacumulação (SANDHOLM *et al.*, 1973). A magnitude dessa bioacumulação dependendo tanto de fatores endógenos (p. ex.: estado fisiológico, idade e hábito alimentar dos organismos presentes no ambiente) como exógenos (p. ex.: O.D, temperatura, pH e alcalinidade da água; velocidade de fluxo; tipo de sedimento; presença de elementos contaminantes e vivos no meio) (REINCHENCKBACK-KLINKE, 1982). Apesar de ainda não se ter definido a toxicidade deste elemento para a ictiofauna, sabe-se que 3,0mg/kg de Se já é tóxico para pequenos mamíferos (DeMAYO *et al.*, 1979).

Segundo GATLIN e WILSON (1984), a contaminação dos ecossistemas aquáticos por selênio causa efeitos tóxicos em peixes, tais como, redução do crescimento e mortalidade.

Os efeitos sub-letais prevalentes em peixes expostos à alta concentração de selênio, inclui redução nos níveis de hematócrito e hemoglobina, edemas, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aparecimento de aberrações cromossômicas e complicações no miocárdio e pericárdio (PETERS *et al.*, 1999; DEAKER e MAHER, 1997).

A manifestação primária da toxicidade do selênio é a falha no processo de síntese protéica. Quando em excesso, o selênio substitui erroneamente o enxofre, resultando em compostos que impedem a formação de ligações importantes. O resultado disso são enzimas e moléculas protéicas distorcidas e disfuncionais, que impedem processos bioquímicos normais das células. A substituição do enxofre pelo selênio prejudica a formação de proteínas, tanto em peixes jovens como em adultos, sendo que muitos órgãos e tecidos internos desenvolvem processos patológicos crônicos, assintomáticos (LEMLY, 2002).

Muitas pesquisas têm sido direcionadas ao estudo da poluição aquática, mas as conseqüências de interações simultâneas entre dois ou mais poluentes no mesmo organismo aquático ainda são pouco conhecidas. Uma forte suposição a respeito da ação antagônica do selênio sobre o efeito tóxico do mercúrio vem sendo investigada e demonstrada em pesquisas sobre interação de poluentes em diversos organismos (STOEWSAND *et al.*, 1974; JØRGENSEN e HEISINGER, 1987; CUVIN e FURNESS, 1988).

Numerosos estudos têm sido realizados sobre a interação mercúrio-selênio, mas o mecanismo de desintoxicação do mercúrio não tem sido bem definido. Além disso, a ação antagônica do selênio contra o mercúrio é bastante complexa e é altamente dependente da fonte alimentar e da forma química do selênio (CAPPON e SMITH, 1982).

Uns dos primeiros estudos sobre o efeito antagônico do selênio sobre a toxicidade do mercúrio foram conduzidos por PARIZEK e OSTADALOVA (1967) em ratos de laboratório.

Este estudo induziu numerosas investigações sobre a interação do mercúrio e selênio em outros organismos (CUVIN e FURNESS, 1988). Em estudos com peixes, o tratamento com selênio dissolvido diretamente na água simultaneamente com o mercúrio resultou em baixa mortalidade, em relação àqueles submetidos ao tratamento somente com mercúrio (CUVIN e FURNESS, 1988).

Mesmo com todas as teorias apresentadas, o mecanismo de interação Se-Hg ainda é desconhecido e, portanto, a maioria delas é especulativa (CRAIG, 1986).

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. Os organismos representativos do ambiente são utilizados como organismos teste, sendo submetidos a diferentes concentrações do agente tóxico, por um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). De acordo com SOARES (1991), os testes de toxicidade servem de base para a política adequada de gestão dos recursos ambientais, constituindo um instrumento fundamental na preservação do 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 são utilizadas diferentes concentrações de dada substância, dentro de condições pré-estabelecidas. O efeito observado ao final de 96 horas de exposição é a imobilidade ou a mortalidade dos organismos. Com os dados de mortalidade obtidos, determina-se a CL_{50} (Concentração Letal Média), isto é, a concentração que causa mortalidade em 50% dos organismos em 96 horas (CETESB, 1999). Nos testes de toxicidade crônica o tempo de exposição envolve períodos mais longos com concentrações sub-letais, no qual se avaliam os parâmetros de comportamento e as 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).

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

3- OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo:

- analisar por meio de teste de toxicidade aguda (96 h) a capacidade do selênio em reduzir o efeito de letalidade causado pelo mercúrio em tilápia.

- analisar por meio de testes de toxicidade crônica utilizando-se as análises hematológicas, as alterações provocadas pelas duas formas de selênio (selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$)) e se estas têm efeito antagônico ou minimizam a toxicidade do cloreto de mercúrio (HgCl_2) para a tilápia.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Descrição Geral

Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica, utilizando-se alevinos e jovens de tilápia, *O. niloticus*, adquiridos de pisciculturas comerciais. Nos testes de toxicidade aguda os alevinos foram expostos ao mercúrio e ao selênio a fim de se avaliar o efeito do selênio na redução da toxicidade causada pelo mercúrio. Nos testes de toxicidade crônica foram utilizados jovens de tilápia expostos a concentrações sub-letais de mercúrio e selênio para avaliar, através de análises hematológicas se o selênio tem efeito antagônico ou minimiza a toxicidade do mercúrio.

4.2- Condução dos Bioensaios

A metodologia para condução de bioensaios foi padronizada de acordo com as recomendações expressas por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – APHA (1998).

Os experimentos foram realizados no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca – SP, em ambiente climatizado (fotoperíodo 10L : 14 E e temperatura: 25°C).

Os peixes utilizados nos testes de toxicidade aguda e crônica foram aclimatados por um período de duas semanas, em tanque com água de clorada com capacidade de 250 L. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial e ficaram sob observação a fim de verificar possíveis sinais de doenças, estresse, presença de parasitas, danos físicos e mortalidade. Em seguida os mesmos foram transferidos em aquários de 40 L e aclimatados novamente por 48 horas, nas mesmas condições de bioensaio (local x densidade).

A água utilizada tanto nos experimentos quanto para a preparação e diluição das concentrações testadas, era 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 substâncias químicas utilizadas foram: cloreto de mercúrio (HgCl_2), selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$), todos do laboratório Synth[®].

Soluções estoques das substâncias químicas utilizadas foram previamente preparadas. O cloreto de mercúrio foi diluído na proporção de 0,1354g em 1000 mL de água MILLI-Q, resultando em uma solução concentrada de $100\text{mgHg} \cdot \text{L}^{-1}$. O selenito de sódio e o selenato de sódio foram diluídos na proporção de 1,666g e 1,197g respectivamente em 500 ml de água MILLI-Q resultando em concentrações de $1000 \text{mgSe} \cdot \text{L}^{-1}$.

Estas soluções foram pipetadas e diluídas diretamente nos aquários, em quantidade suficiente para proporcionar as concentrações testadas. Logo após a adição da substância química, a água foi agitada para promover a homogeneização das soluções.

As seguintes variáveis físicas e químicas da água foram monitoradas 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 ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$) por titulometria e amônia total ($\text{mg NH}_4/\text{L}$) pelo método colorimétrico do reagente de Nessler, foram realizadas no início e ao final dos experimentos.

4.3- Teste de Toxicidade Aguda

Para este teste foram utilizados alevinos de tilápia, *O. niloticus*, com peso médio de $0,33 \pm 0,08$ g e comprimento total médio de $2,9 \pm 0,29$ cm (Figura 2).



Figura 2 – Alevino de tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizado no experimento de toxicidade aguda com Hg e Se

Os alevinos foram transferidos para aquários com sistema de aeração artificial, contendo 5 L de solução-teste.. A densidade foi de 2 alevinos / L e o sistema utilizado foi o semi-estático, onde a solução era substituída a cada 24 horas. Os aquários eram revestidos internamente com sacos plásticos transparentes para evitar a contaminação destes com as substâncias químicas utilizadas. O período total de exposição foi de 96 horas, durante os quais os peixes não foram alimentados (APHA, 1998).

A concentração de mercúrio utilizada neste experimento foi definida em testes preliminares, considerada concentração letal média – CL_{50} ($0,4 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$). Essa concentração foi associada a $1,0 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$ de selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e de selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$), definidas como concentração de efeito letal não observado (CELNO), a partir das observações feitas no estudo desenvolvido por GONÇALVES (2004).

Os tratamentos consistiram na seguinte composição: **I**) grupo controle; **II**) somente Hg (CL_{50}); **III**) somente Se^{4+} (CELNO); **IV**) somente Se^{6+} (CELNO); **V**) Se^{4+} (CELNO) + Hg (CL_{50}) e **VI**) Se^{6+} (CELNO) + Hg (CL_{50}).

Os aquários foram dispostos em quatro repetições, contendo cinco tratamentos diferentes e mais o grupo controle, totalizando 24 aquários (Figura 3).



Figura 3 – (a) Vista da bateria de aquários utilizados no teste de toxicidade aguda com Hg e Se, (b) sistema de aeração artificial utilizado durante o experimento de toxicidade aguda com Hg e Se

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

Os resultados foram avaliados através da aplicação do teste estatístico “ANOVA” e teste Tukey para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos. (ZAR, 1996).

4.4- Teste de Toxicidade Crônica

Foram utilizados jovens de tilápia, *O. niloticus*, adquiridos de uma piscicultura comercial com peso médio de $32,04 \pm 5,35$ g e comprimento médio de $10,27 \pm 1,39$ cm (Figura 4).



Figura 4 - Jovem de tilápia *Oreochromis niloticus*, utilizada no experimento de toxicidade crônica com Hg e Se

Ao final do período de aclimação, os jovens foram transferidos para aquários revestidos internamente com sacos plásticos transparentes, contendo 40 L de solução-teste e providos de aeração artificial. Os aquários eram revestidos internamente com sacos plásticos transparentes para evitar a contaminação destes com as substâncias químicas utilizadas. O sistema utilizado foi o semi-estático, onde 1/3 da solução era substituída a cada 3 dias.

Os aquários foram dispostos em três repetições, contendo cinco tratamentos diferentes com concentrações sub-letais de Hg e Se e mais o grupo controle, totalizando 18 aquários (Figura 5).



Figura 5 – Aquários utilizados para o teste de toxicidade crônica realizado com tilápia *Oreochromis niloticus* contaminada com Hg e Se

As concentrações de selenito de sódio e selenato de sódio usadas foram definidas a partir dos resultados observados por GONÇALVES (2004) e a concentração de mercúrio a partir dos resultados de ISHIKAWA (2003), por meio do teste de toxicidade crônica em tilápia, *O. niloticus*. As concentrações testadas neste estudo foram: $0,08 \text{ mg Hg} \cdot \text{L}^{-1}$; $0,4 \text{ mg Se}^{4+} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,4 \text{ mg Se}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$.

Os tratamentos consistiram na seguinte composição: **I)** controle; **II)** somente Hg; **III)** somente Se^{4+} ; **IV)** somente Se^{6+} ; **V)** $\text{Se}^{4+} + \text{Hg}$ e **VI)** $\text{Se}^{6+} + \text{Hg}$. No início do experimento, coletou-se sangue de seis indivíduos antes da distribuição de peixes nos aquários, sendo denominados como momento zero. O experimento foi conduzido durante 14 dias, na densidade de 16 peixes por aquário, com amostragem de dois indivíduos por tratamento, de cada repetição, totalizando seis indivíduos por tratamento, nos intervalos de 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Nos períodos de coleta os peixes eram alimentados diariamente com ração extrusada, com 30% de proteína bruta, seguido de sifonagem do excedente e de excretas e substituição de 1/3 da água, por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.

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, heparinizadas (Figura 6). Após a retirada do sangue os peixes eram sacrificados e descartados.

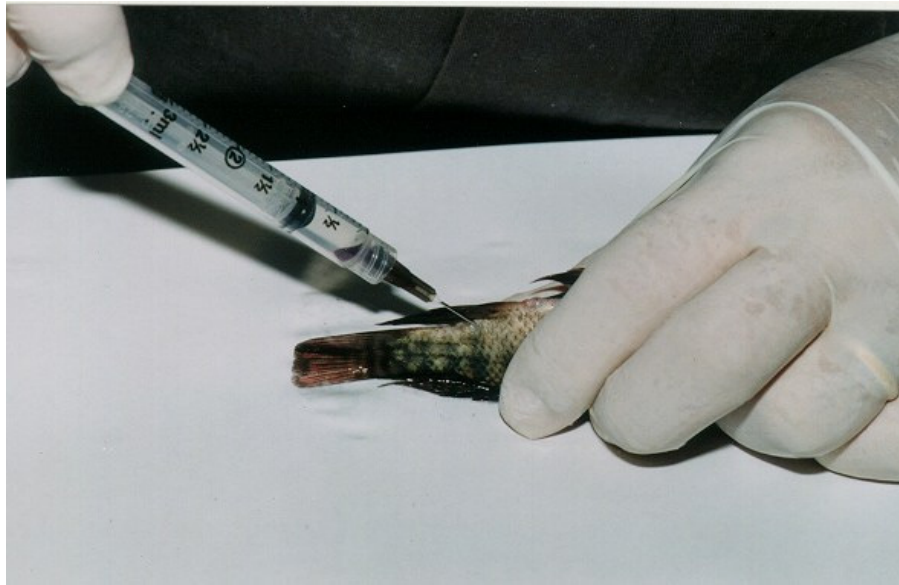


Figura 6 - Coleta de sangue por punção caudal em jovem de *Oreochromis niloticus*

Com as amostras de sangue foram determinados: número de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer, utilizando-se o diluente de Hayem, hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971), taxa de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944) e calculados os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), segundo WINTROBE (1934).

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos ao teste estatístico “ANOVA” e teste Tukey, comparando a diferença entre as médias dos tratamentos, por tempo e entre as concentrações (ZAR, 1996).

5- RESULTADOS

5.1- Toxicidade Aguda

As variáveis físico-químicas da água utilizada durante o período de bioensaio de toxicidade aguda (Tabelas 1 e 2) não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando todas dentro dos níveis ideais recomendados por BOYD (1982) para a manutenção de peixes em sistemas de cultivo.

Tabela 1 – Média das variáveis físico-químicas da água no teste de toxicidade aguda em *Oreochromis niloticus* exposta ao Hg e ao Se

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Dureza total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Amônia não ionizada (mg.L ⁻¹)
Controle	13.32	20.58	0.021
CELNO Se ⁴⁺	11.42	19.60	0.016
CELNO Se ⁶⁺	13.32	19.60	0.014
Hg	13.32	19.60	0.035
Hg + CELNO Se ⁴⁺	13.32	19.60	0.014
Hg + CELNO Se ⁶⁺	13.32	21.56	0.033

CELNO – Concentração de Efeito Letal Não Observado

Tabela 2 – Média e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água no teste de toxicidade aguda em *Oreochromis niloticus* exposta ao Hg e ao Se

Tratamento (mg.L ⁻¹)	pH	Condutividade elétrica (µScm ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (% saturação)	Temperatura (°C)
Controle	7,50 ± 0,32	69,13 ± 3,70	7,42 ± 0,20	96,30 ± 1,52	23,30 ± 0,75
CELNO Se ⁴⁺	7,76 ± 0,19	73,01 ± 3,37	7,76 ± 0,19	97,35 ± 0,99	22,64 ± 0,27
CELNO Se ⁶⁺	7,87 ± 0,14	72,60 ± 2,60	7,47 ± 0,20	96,25 ± 1,44	23,38 ± 0,71
Hg	7,86 ± 0,12	71,04 ± 3,33	7,51 ± 0,21	97,31 ± 0,87	23,56 ± 0,69
Hg + CELNO Se ⁴⁺	7,93 ± 0,19	70,21 ± 6,36	7,93 ± 0,19	97,05 ± 1,28	23,46 ± 0,74
Hg + CELNO Se ⁶⁺	7,85 ± 0,17	73,09 ± 4,99	7,50 ± 0,20	97,50 ± 1,03	23,51 ± 0,74

CELNO – Concentração de Efeito Letal Não Observado

Os resultados de mortalidade das tilápias expostas aos diferentes tratamentos de mercúrio e selênio, por 96 horas, são apresentados na Tabela 3.

Após 24 horas de exposição, nos tratamentos que continham mercúrio, os peixes apresentaram sinais clínicos de intoxicação tais como: hiperatividade, escurecimento da pele, natação desordenada, maior batimento das nadadeiras, aumento nos movimentos operculares, dispnéia e morte.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos índices de mortalidade entre o tratamento com apenas Hg e os que o associavam ao Se (Hg + CELNO Se⁴⁺ e Hg + CELNO Se⁶⁺). Os tratamentos com apenas Se não diferiram do grupo controle, evidenciando que as concentrações usadas são realmente concentrações de efeito letal não observado.

Tabela 3 – Mortalidade média acumulativa (%) em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda com Hg e Se

Tratamentos	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
Controle	0,0	5,0	5,0	5,0 ^b
Hg	7,5	15,0	32,5	50,0 ^a
CELNO Se⁴⁺	2,5	5,0	5,0	7,5 ^b
CELNO Se⁶⁺	0,0	0,0	2,5	15,0 ^b
Hg + CELNO Se⁴⁺	2,5	5,0	25,0	32,5 ^a
Hg + CELNO Se⁶⁺	15,0	25,0	37,5	55,0 ^a

Os valores na coluna com a mesma letra (a., b) não diferem estatisticamente entre si

CELNO – Concentração de Efeito Letal Não Observado

5.2- Toxicidade Crônica

As variáveis físico-químicas da água utilizada durante o período de bioensaio de toxicidade crônica (Tabelas 4 e 5), não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando todas elas dentro dos níveis ideais recomendados por BOYD (1982) para a manutenção de peixes em sistemas de cultivo.

Tabela 4 – Valores médios das variáveis físico-químicas da água no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* exposta ao Hg e ao Se

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	Amônia não ionizada (mg.L ⁻¹)
Controle	21,80	21,12	0,034
Hg	22,30	22,52	0,034
Se⁴⁺	23,78	21,11	0,035
Se⁶⁺	23,84	21,11	0,034
Hg + Se⁴⁺	22,37	23,21	0,032
Hg + Se⁶⁺	21,65	21,11	0,035

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* exposta ao Hg e ao Se

Tratamento (mg.L ⁻¹)	pH	Condutividade elétrica (μScm ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (% saturação)	Temperatura (°C)
Controle	7,63 ± 0,38	148,97 ± 42,46	6,52 ± 0,91	85,00 ± 10,30	24,02 ± 1,32
Hg	7,80 ± 0,25	136,56 ± 37,30	6,36 ± 1,03	83,00 ± 11,85	23,72 ± 1,31
Se⁴⁺	7,77 ± 0,23	143,55 ± 43,55	6,15 ± 0,82	80,00 ± 09,33	23,78 ± 1,34
Se⁶⁺	7,83 ± 0,00	150,00 ± 45,60	6,40 ± 0,90	83,00 ± 10,00	23,60 ± 0,90
Hg + Se⁴⁺	7,85 ± 0,20	141,40 ± 36,50	6,50 ± 1,00	85,00 ± 08,05	23,90 ± 0,90
Hg + Se⁶⁺	7,76 ± 0,00	130,30 ± 36,59	6,40 ± 0,80	83,00 ± 09,10	23,80 ± 0,90

Analisando os dados obtidos através da análise estatística para as diferentes características hematológicas foi observado que somente os peixes do tratamento contendo a associação mercúrio + selenito de sódio não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo, demonstrando menores variações durante o período de experimentação (Figuras 7 e 8).

No final de 14 dias os valores médios de eritrócitos, em todas as concentrações testadas, apresentaram maiores valores do que no início do experimento (Figura 7 a). Nos tratamentos de mercúrio e de associação mercúrio e selênio houve diminuição nos números de eritrócitos, nos primeiros dias de experimento.

Pela Figura 7 b e c verifica-se que os valores médios do hematócrito e da taxa de hemoglobina reduziram-se em todas as concentrações testadas, durante os três primeiros dias de experimento.

O valor médio de VCM no início do experimento foi de $182,50 \mu^3$ sendo que no final de 14 dias demonstrou redução nos peixes de todos os tratamentos, com média de $150,50 \mu^3$ (Figura 8 a).

No final do experimento os valores médios de HCM dos peixes de todos os tratamentos também demonstraram redução em seus valores com média de $42,38 \mu\text{g}$ se comparado ao início do experimento com valor médio de $52,2 \mu\text{g}$ (Figura 8 b).

A média de CHCM dos peixes mantidos na concentração mercúrio + selenato de sódio apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos do grupo controle no décimo dia de coleta (Figura 8 c). Entre o décimo e décimo quarto dia de coleta os peixes desse mesmo tratamento mostraram aumento no CHCM.

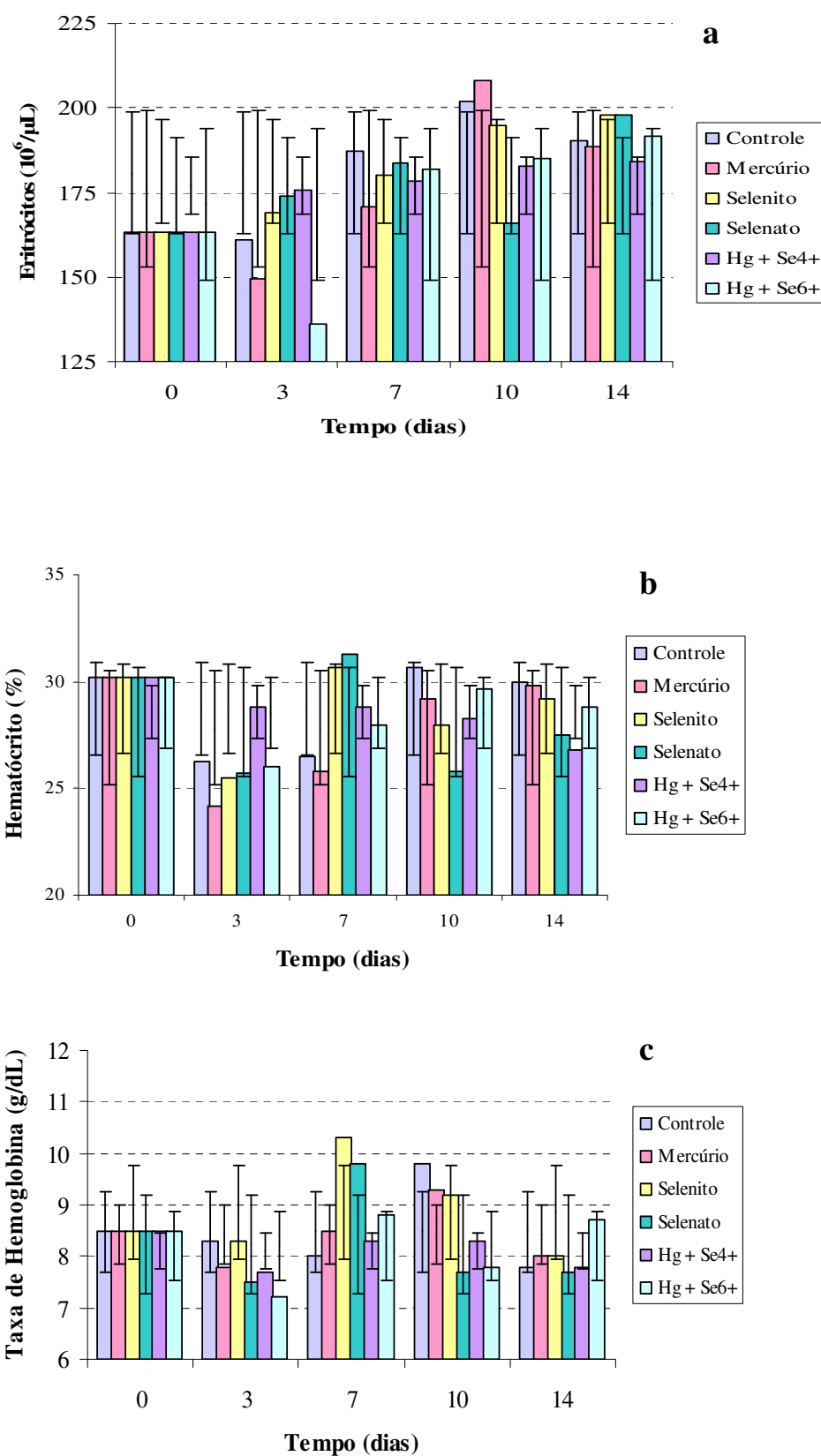


Figura 7 - Variação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de tilápia, *O. niloticus*, exposta às concentrações de mercúrio, selenito e selenato de sódio, nos diferentes momentos de coleta

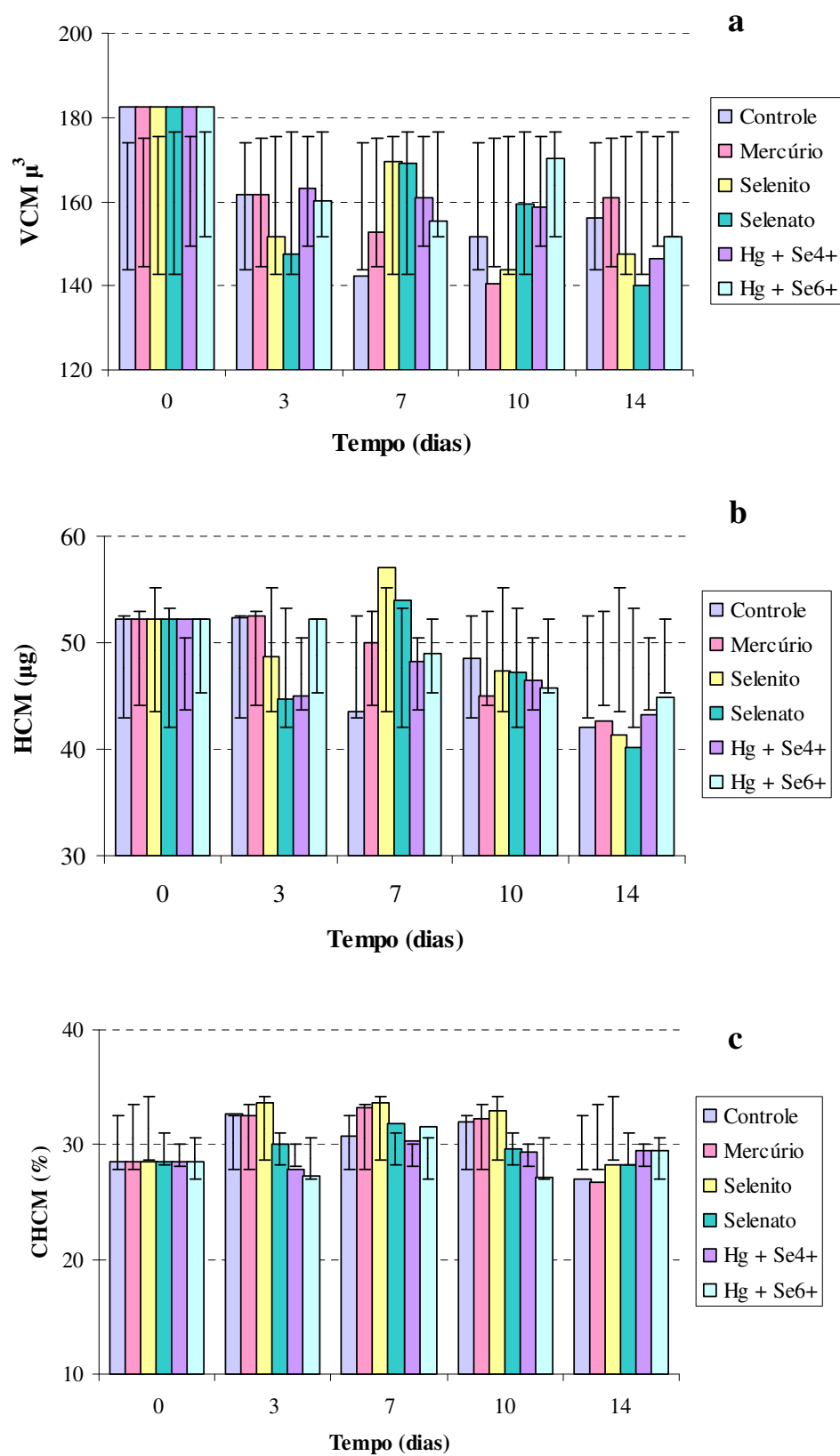


Figura 8 - Variação dos valores médios e desvio padrão dos índices hematimétricos de tilápia, *O. niloticus*, exposta as concentrações de mercúrio, selenito e selenato de sódio, nos diferentes momentos de coleta

6- DISCUSSÃO

De acordo com MIKRYAKOV e LAPIROVA (1997) a contaminação por mercúrio nos peixes leva a alterações indesejáveis para 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. Os sinais clínicos de intoxicação causados pelo mercúrio verificado no teste de toxicidade aguda do presente estudo, também foram observados por BOLDRINI e PÁDUA (1983), os quais relataram rigidez do corpo, estiramento das nadadeiras, movimentos lentos, perda de equilíbrio, asfixia e morte.

O selênio tem sido sugerido como recurso para reduzir a intoxicação causada pela contaminação por mercúrio (RUDD *et al.*, 1980), e o seu uso tem sido investigado em diversas pesquisas devido a forte suposição do seu efeito antagônico sobre a ação tóxica do mercúrio.

STOEWSAND *et al.* (1974), adicionando selênio numa concentração de 5 ppm na ração de *Coturnix coturnix japonica* observaram efeito antagônico do selênio contra a intoxicação causada pelo metilmercúrio (20 ppm), resultando em apenas 21% de mortalidade, sendo que na dieta com ração contendo somente metilmercúrio apresentou 92,2% de mortalidade.

Em estudos realizados por CURVIN e FURNESS (1988) expondo *Phoxinus phoxinus* ao selenato de sódio ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em combinação com o cloreto de mercúrio ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dissolvidos na água, mostraram taxas de sobrevivência significativamente altas em relação àqueles organismos expostos somente ao mercúrio.

Porém com base nos resultados obtidos no presente trabalho não foi observado tal efeito (Tabela 3), pois não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos de mercúrio e nas associações, demonstrando que tanto o selenito de sódio quanto o selenato de sódio não manifestaram efeito antagônico sobre a ação tóxica do mercúrio, apresentando grande mortalidade dos peixes expostos aos tratamentos de associação destes elementos.

PEDERSEN *et al.* (1998) observaram que a exposição de selenito e selenato de sódio dissolvidos na água não afetou a absorção de metilmercúrio através do epitélio branquial de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e não apresentou mudança na taxa pelo qual o este metal é liberado das brânquias, sugerindo que quaisquer interações entre selênio e mercúrio na água não influenciam diretamente a absorção ou a liberação do mercúrio das brânquias. Estes autores sugerem ainda que a absorção de selênio dissolvido na água através das brânquias ocorre muito lentamente e o curto tempo de exposição não afetou a absorção ou liberação do metilmercúrio.

Em relação às diferentes características hematológicas, nos três primeiros dias de experimento (Figura 7 a, b, c), verifica-se que houve diminuição no número de eritrócitos apenas nos tratamentos de associação de mercúrio e selênio. Já para o hematócrito e a taxa de hemoglobina ocorreu redução em todas as concentrações. Resultados semelhantes foram encontrados por FLETCHER e WHITE (1986) para *Aphanius dispar* exposto ao cloreto de mercúrio. Estes autores afirmam que a diminuição de eritrócitos e hematócrito estão relacionadas com o processo de hemólise das hemácias em consequência da toxicidade do mercúrio ou do selênio. Por outro lado esta redução nos valores dos parâmetros sanguíneos logo no início do experimento se deve provavelmente ao estresse do confinamento e da manipulação, como foi observado por AFFONSO *et al.* (2002) em *Colossoma macropomum*, exposto ao H₂S por 96 horas e por ISHIKAWA (2003) e por GONÇALVES (2004) em *Oreochromis niloticus* expostas ao Hg e ao Se, respectivamente.

No presente trabalho os valores médios de eritrócitos, taxa de hematócrito e taxa de hemoglobina não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (Figura 7 a, b, c). Entretanto, ao final de 14 dias o número de eritrócitos, em todas as concentrações testadas, apresentaram maiores valores do que no início do experimento (Figura 7 a). Em estudos realizados com *Channa punctatus* (JUNEJA e MAHAJAN, 1983) e em truta arco-íris (O'CONNOR e FROMM, 1975) expostos ao Hg, foi notado aumento do número de eritrócitos e

hematócrito. Estes últimos autores observaram no início do experimento, queda de hematócrito e ao final de 12 semanas, constatou o oposto. Os autores mencionam a possibilidade de que tenha ocorrido estimulação dos tecidos eritropoiéticos em resposta à diminuição de eritrócitos ocasionados pela hemólise destas células como consequência da exposição ao mercúrio. Além disso, OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (2000) relatam que peixes expostos ao mercúrio 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 eritrócitos, da hemoglobina e do CHCM como mecanismo para aumentar o carreamento de oxigênio correlacionando assim, as alterações sanguíneas como fator secundário da lesão do mercúrio nas brânquias dos peixes (AFFONSO *et al.*, 2002).

A redução nos valores de VCM no final de 14 dias sugere anemia microcítica onde houve diminuição do diâmetro dos eritrócitos, provavelmente devido à hipóxia, estresse. Isto é resultado da diminuição da taxa de hemoglobina e da quantidade de hemoglobina dentro dos eritrócitos (HCM) (Figura 8). Segundo NUSSEY *et al.* (1995), o decréscimo do VCM é resultado do grande número de células vermelhas imaturas liberadas na circulação sanguínea para conter uma ação patogênica. Além disso, o volume corpuscular médio dá uma indicação do estado ou do tamanho das células vermelhas e reflete a divisão celular anormal durante a eritropoiese (LARSSON *et al.*, 1985).

Embora os valores médios de CHCM dos peixes expostos à concentração de associação do mercúrio + selenato de sódio tenham apresentado diferença significativa em relação ao grupo controle no 10º dia de coleta (Figura 8 c), verificou-se que este índice pouco se alterou ao longo do tempo. Isto pode estar indicando que a concentração de hemoglobina dentro dos eritrócitos permaneceu a mesma, a despeito dessas células apresentarem alteração em seu tamanho talvez em consequência da dificuldade respiratória causada por este tratamento. Além disso, nos últimos

dias de experimento os peixes do tratamento Hg + Se⁶⁺ apresentaram aumento de CHCM, da taxa de hemoglobina e também do número de eritrócitos como possível mecanismo para aumentar o carreamento de oxigênio (AFFONSO *et al.*, 2002).

Segundo FLETCHER e WHITE (1986) a causa mais provável da toxicidade do mercúrio é a sua afinidade aos grupos sulfidrilas nas proteínas da membrana das células, afetando a sua conformação e permeabilidade. RIBAROV e BENOVA (1981) sugeriram que a peroxidação da membrana lipídica é também um possível mecanismo de dano para as membranas dos eritrócitos na hemólise induzido pelo metal.

De acordo com CRAIG (1986), cada molécula de selênio pode induzir a formação de um grande complexo selenioproteico capaz de se ligar a vários átomos de mercúrio. Este mesmo autor concluiu que o selênio pode alterar a distribuição do mercúrio nos tecidos por deslocar este metal do complexo formado com o grupo sulfidrilas das proteínas, a causa principal de sua toxicidade. O selênio pode, ainda, juntamente com a vitamina E, agir como antioxidante, contra atacando o efeito dos radicais livres produzidos pela ação tóxica do mercúrio nas membranas celulares (SORENSEN, 1991).

A ineficácia do selênio na redução do efeito tóxico do mercúrio no presente estudo se deve provavelmente ao curto tempo de exposição, uma vez que a absorção do selênio da água se dá muito lentamente (PEDERSEN *et al.*, 1998), ou a concentração de selênio utilizada não foi adequada para combater o efeito tóxico do mercúrio. Por outro lado, se concentrações altas de selênio fossem utilizadas neste experimento, talvez este próprio elemento pudesse causar mais efeitos tóxicos.

Segundo STOEWSAND *et al.* (1974) a proporção 1:1 de mercúrio e selênio foi a mais eficaz na redução dos sintomas neurológicos e na morte em *Coturnix coturnix japonica* intoxicados pelo metilmercúrio. CUVIN e FURNESS (1988) encontraram que a concentração

molar de aproximadamente 1,5:1 de mercúrio e selênio foi eficiente no combate da mortalidade causada pelo mercúrio inorgânico em *Phoxinus phoxinus*.

RUDD *et al.* (1980) sugerem que a proporção mercúrio e selênio na biota de sistemas de água doce contaminada com mercúrio poderão ser favoravelmente ajustados. Portanto a bioacumulação do selênio pelo peixe poderá ser muito promissora, mas antes deste elemento ser usado como meio para combater o efeito tóxico do mercúrio é necessário investigar cuidadosamente os aspectos diretos e indiretos da toxicidade do selênio não só aos organismos aquáticos, mas também ao homem. Certos aspectos deste estudo podem proporcionar manejos alternativos para combater os problemas causados pelo mercúrio e outros metais pesados.

As interações entre o selênio e o mercúrio em organismos aquáticos são certamente uma realidade, mas o verdadeiro antagonismo entre estes dois elementos ainda não foi claramente demonstrado no ambiente aquático (PELLETIER, 1985). Assim como no presente estudo, o melhor conhecimento químico e bioquímico da interação mercúrio-selênio em organismos aquáticos poderá levar a aplicações práticas muito importantes.

Com os resultados obtidos em relação aos parâmetros sanguíneos percebeu-se que as alterações sanguíneas não foram afetadas significativamente pelo mercúrio. Supõe-se, então, que essa espécie é resistente aos efeitos tóxicos do Hg nesta concentração no período estudado e mais vulnerável ao estresse. Portanto, fica difícil afirmar se a alteração sanguínea causada pela concentração de associação mercúrio + selenato de sódio foi devido a ineficácia do selênio ou se a sua presença foi prejudicial, já que as duas formas de selênio também não causaram alterações significativas. Acredita-se, portanto, que seja necessário a utilização de concentrações mais altas de mercúrio ou de maior tempo de exposição em pesquisas futuras.

Mesmo não tendo apresentado diferença significativa entre os tratamentos de mercúrio e nas associações no teste de toxicidade aguda, observou-se que o tratamento de mercúrio + selenito de sódio apresentou menor mortalidade (32,5%) do que o tratamento de mercúrio + selenato de

sódio (55%) e somente mercúrio (50%), sugerindo que o selenito de sódio associado com o mercúrio parece reduzir o efeito de letalidade causada pelo mercúrio.

Observando os resultados do teste de toxicidade crônica, o tratamento de associação mercúrio + selenito de sódio apresentou menores variações nos parâmetros sanguíneos se comparado com os demais tratamentos (Figuras 7 e 8), este tratamento (selenito + mercúrio) foi o único que não apresentou diferença significativa ao longo do tempo, sugerindo que o selenito de sódio parece ter uma leve tendência na redução da toxicidade causada pelo mercúrio.

7- CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou no experimento de toxicidade aguda que as duas formas de selênio (selenito e selenato de sódio), nas concentrações usadas não provocaram efeito antagônico ao mercúrio, pois este causou efeitos tóxicos mesmo em associação ao selênio.

No experimento de toxicidade crônica a concentração de mercúrio utilizada não provocou alterações significativas nas variáveis sanguíneas. As alterações observadas devem ser atribuídas mais ao estresse do experimento do que à toxicidade dos metais pesados empregados nos experimentos.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C: 375-382.
- ALLEN, P. 1994. Changes in the haematological profile of the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) during acute inorganic mercury intoxication. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108 (1): 117-121.
- APHA; AWWA; WPCF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 ed. Washington, D.C. APHA – American Public Helath Association, AWWA – American Water Works Association, and WPCF – Water Pollution Control Federation.
- 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.
- BISWAS, S.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. 1997. Selenium salts and chromosome damage. *Mutation Research*, 390: 201-205.
- BOLDRINI, C.V. e PÁDUA, H.B. 1983. Contaminação por mercúrio nos rios Mogi-Guaçu 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.
- BOYD, C.E. 1982. *Water quality management for pond fish culture*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company. 318p.
- BRINCKMAN, F.E. e IVERSON, W.P. 1975. Chemical and bacterial cycling of heavy metals in the estuarine system. In: CHURCH, T.M. *Marine chemistry in the coastal environment*. American Chemical Society Symposium Series 18. Washington. p. 319-42.
- 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.

- CAPPON, C.J. e SMITH, J.C. 1982. Chemical form and distribution of mercury and selenium in edible seafood. *Journal of analytical toxicology*, 6: 10-21.
- 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. no. de páginas Tese. Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, Universidade Federal de São Carlos.
- CETESB 1986a. Avaliação dos níveis de contaminação por mercúrio na água, sedimento e peixes na Represa de Barra Bonita e seus rios formadores: Piracicaba e Tietê. São Paulo. CETESB. 115 p.
- CETESB. 1999. *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1: 149p.
- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Ass. J.*, 50: 550-552.
- CONAMA. 1986b. Resolução N° 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.
- CRAIG, P.J. 1986. Organomercury compounds in the environment. In: P.J. CRAIG (Ed)., *Organometallic Compounds in the Environment*. Longman, Harlow, pp. 65-110.
- CUVIN, M.L.A.; FURNESS, R.W. 1988. Uptake and elimination of inorganic mercury and selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. *Aquatic Toxicology*, 13: 205-216.
- DAMATO, M. 2000. WORKSHOP SOBRE QUALIDADE DA ÁGUA NA AQUICULTURA. Anais-Pirassunga: CEPTA, 92 p.
- DAWSON, M.A. 1990. Blood chemistry of the windowpane flounder *Scophthalmus aquosus* in Long Island Sound: Geographical, seasonal and experimental variations. *Fishery Bulletin*, 88: 429 – 437.
- DEAKER, M. e MAHER, W. 1997. Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 350: 287-294.

- DeMAYO, A.; TAYLOR, M.C. & REEDER, S. Guidelines for surface water quality. Inorganic Chemical Substances. Selenium. v.1. Inland Waters Directorate, Water Quality Branch. Ottawa, Canada. 1979. 21p.
- 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.
- DÍAZ, J.P.; NAVARRO, M.; LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M.C. 1996. Selenium (IV) and (VI) levels in potable, irrigation and waste waters from an industrial zone in southeastern Spain. *The Science of the Total Environment*, 186: 231-236.
- DIETZ, R.; RIGET, F.; BORN, E.W. 2000. An assessment of selenium to mercury in Greenland marine animals. *The Science of the Total Environment*, 245: 15-24.
- EISLER, R. 2000. *Selenium. Handbook of chemical risk assessment: health hazards to humans, plants, and animals*. Vol. 3. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press, p. 1649-1705.
- EYSINK, G.G.J.L; PÁDUA, H.B.; MARTINS, M.C. 1988. Presença do mercúrio no ambiente. *Ambiente*. 2 (1): 43-50.
- FLETCHER, T.C. e WHITE, A. 1986. Nephrotoxic and haematological effects of mercuric chloride in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Aquatic Toxicology*, 8: 77-84.
- GATLIN, D.M. e WILSON, R.P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. *J.Nutr.*, 114: 627-633.
- GERMAN, J.F.B. 1992. *Toxicologia ambiental*. Centro Panamericano de Ecologia e Saúde. Ed. Limusa. 480 p.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. 1990. *Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo, CETESB, 17p.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.*, 56 (1): 59-9.
- GONÇALVES, A. 2004. *Concentração Letal CL_{50-96h} e efeitos sub-letais do selenito de sódio (Na₂SeO₃) em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757): alterações*

- hematológicas e histopatológicas*. Jaboticabal, SP. 70p. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP.
- GUNBY, P. 1981. Selenium may act as cancer inhibitor. *Journal of the American Medicine Association*, 246: 1510.
- HAMILTON, S.J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326: 1-31.
- HERMANSON, M.H. 1998. Anthropogenic mercury deposition to Arctic lake sediments. *Water Air Oil Pollut.*, 101: 309 – 321.
- HOLSBEEK, L.; DAS, H.K.; JOIRIS, C.R. 1997. Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish. *The Science of the Total Environment*, 198: 201 – 210.
- HUNN, J.B.; HAMILTON, S.J.; BUCKLER, D.R. 1987. Toxicity of sodium selenite to rainbow trout fry. *Water Research*, 21 (2): 233-238.
- 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.
- ISHIKAWA, N.M. 2003. *Toxicidade aguda e crônica do mercúrio em tilápia “Tailandesa”, Oreochromis niloticus. Determinação da CL_{50-96h} e alterações hematológicas*. Jaboticabal, SP. 52 p. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP.
- JARDIM, W.F. 1988. Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias. *Ciência Hoje*, 7 (41).
- JØRGENSEN, D. e HEISINGER, J.F. 1987. The effects of selenium on the distribution of mercury in the organs of the black bullhead (*Ictalurus melas*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A, 181-186.
- 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.
- KAI, N.; UEDA, T.; TAKEDA, Y.; KATAOKA, A. 1988. Mercury and selenium levels in blood of tunas. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (11): 1981-1985.
- KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TOKUMARU, M. 1983. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 10: 53–60.

- LARSSON, A.; HAUX, C.; SJÖBECK, M. 1985. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9: 250-281.
- LEMLY, A.D. 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews lake case example. *Aquatic Toxicology*, 57: 39-49.
- 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.
- MAZON, A.F., PINHEIRO, G.H.D., FERNANDES, M.N. 2002. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: Estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; ROCHA, O.; BOHER, M. B. C.; OLIVEIRA-NETO, A. L. *Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI*. Editora RiMa, São Carlos SP. 575p.
- 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.; LUCHESE, E.B. 1997. Mercury in two fish species from the Paraná River floodplain, Paraná, Brazil. *Environmental Pollution*, 98 (1): 123 – 127.
- NAS. 1976. *Selenium. Medical and biological effects of environmental pollutants*. Division of Medical Sciences, National Academy of Sciences. Editor, Hemphill, D.D. Washington, D.C.
- NRIAGU, J.O. e PACYMA, J.M. 1988. Quantitative assesment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*. 333: 134-139.
- NUSSEY, G.; VAN-VUREN, J.H.J.; DU-PREEZ, H.H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilápia, *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.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C.; ROULEAU. 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.; COUSINS, R.J. Tissue uptake, subcellular distribution, and metabolism of $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$ and $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$ by *Rainbow trout, Salmo gairdneri*, *J. Fish. Res. Board Can.*, v. 355, p. 381-390, 1978.
- 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.
- PANDEY, A.K.; GEORGE, K.C.; 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.
- PARIZEK, J. e OSTADALOVA, I. 1967. Protective effects of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia*, 23: 142-143.
- PEÁLEZ-RODRIGUEZ, M.; PERET, A. M.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O. 2002. Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; ROCHA, O.; BOHER, M. B. C.; OLIVEIRA-NETO, A. L. *Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI*. Editora RiMa, São Carlos SP. 575p.
- PEDERSEN, T.V; BLOCK, M.; PÄRT, P. 1998. Effect of the selenium on the uptake of methyl mercury across perfused gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 40: 361-373.
- PELLETIER, E. 1985. Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: A review. *Marine Environmental Research*, 18: 111-132.
- PETERS, G.M.; MAHER, W.A.; KRIKOWA, F.; ROACH, A.C.; JESWANI, H.K.; BARFORD, J.P.; GOMES, V.G.; REIBLE, D.D. 1999. Selenium in sediments, pore waters and benthic infauna of Lake Macquarie, New south Wales, Australia. *Marine Environmental Research*, 47: 491-508.

- 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 SILVA-SOUZA, A.T. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Ed. Livraria Varela. pp.89 – 120.
- 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.
- REINCHENBACH-KLINE, H.H. *Enfermedades de los peces*. Zaragoza, España. Acribia. 1982. 507p.
- RIBAROV, S.V. e BENOVA, L.C. 1981. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 640: 721-726.
- RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C.; TJALVE, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.*, 33: 902 – 907.
- RODGERS, D.W.; BEAMISH, F.W.H. 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, v. 8, p. 197-199. 1981
- RUDD, J.W.; TURNER, M.A.; TOWNSEND, B.E.; SWICK, A.; FURUTANI, A. 1980. Dynamics of selenium in mercury-contaminated experimental freshwater ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 848-857.
- SANDHOLM, M.; OKSANEN, H.E.; PESONEN, L. 1973. Uptake of selenium by aquatic organisms. *Limnol. Oceanogr.* 18(3):496-9.
- SCHWARZ, K. e PATHAK, K.D. 1975, The biological essentiality of selenium and the development of biologically active organoselenium compounds of minimum toxicity. *Chemica Scripta*. 8A: 85-95.

- SOARES, A.M.V.M. 1991. Ecotoxicologia e determinação de riscos ecológicos. Prática e Perspectivas. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE. Lisboa, *Anais.....* 1: 43-52.
- SORENSEN, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. Florida. CRC Press. 597p.
- SOUZA, J.R. e BARBOSA, A.C. 2000. *Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia*. Química nova na escola. Nº 12.
- STADTAMAN, T.C. 1980. Selenium dependent enzymes. *Ann. Ver. Biochemistry*, 49: 93.
- STEFFENS, W. 1989. *Principles of fish nutrition*. New York: Ellis Horwood, 384 p.
- STOEWSAND, G.S.; BACHE, C.A.; LISK, D.J. 1974. Dietary selenium protection of methylmercury intoxication of japanese quail. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 11: 152-156.
- STOROZHUK, N.G.; GULEVA, I.B. 1983. Qualitative composition and morphology of blood cells of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Salmonidae), as influenced by mercury. *Journal of Ichthyology*. 23 (5): 128-137.
- STUMM, W. e MORGAN, J.J. 1981. *Aquatic chemistry – an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. John Wiley & Sons, New York. p. 780.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto, SP. 94 pp.
- TCHOUNWOU, P.B.; AYENSU, W.K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. 2003. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology*, 18 (3): 149-169.
- TURNER, D.R. 1990. The chemistry of metal pollutants in water. In: HARRISON, H.M (Ed). *Pollution: Causes, effects and control*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 19-32).
- UNDERWOOD, E.J. *Trace elements in human and animal nutrition*. Academic Press. 1971. New York and London.
- VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. 2000. *Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. 399 p.

- WATANABE, T. e SATOH, V.K.S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207.
- WATRAS, C.J.; BACK, R.C.; HALVORSEN, S.; HUDSON, R.J.M.; MORRISON, K.A.; WENTE, S.P. 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *The Science of the Total Environment*, 219: 183 – 208.
- WHO. 1986. Environmental Health Criteria 86. Mercury – Environmental Aspects. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WINTROBE, M.M. 1934. Variation in the science and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.
- WREN, C.D.; MACCRIMMON, H.R. Mercury levels in the sunfish, *Lepomis gibbosus*, relative to pH and other environmental variables of precambrian Shield Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 40, p. 1737-1745, 1983.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p.