

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXICIDADE DO SULFATO DE COBRE E DO SULFATO DE  
ZINCO PARA RÃ-TOURO, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802:  
TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA E PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS**

**ADRIANA SACIOTO MARCANTONIO**

**ORIENTADORA: Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI-PAIVA  
CO-ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA MARIS FERREIRA**

**Tese apresentada ao programa de pós-  
graduação em Aquicultura de Águas  
Continentais, como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor**

**JABOTICABAL – SP  
Junho / 2005**

M313t Marcantonio, Adriana Sacioto  
Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos / Adriana Sacioto Marcantonio. -- Jaboticabal, 2005  
vii, 92 f. : il ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2005  
Orientador: Maria José Tavares Ranzani-Paiva  
Banca examinadora: Irene Bastos Franceschini Vicentini, Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Hércio Luis de Almeida Marques, Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein  
Bibliografia

1. Toxicologia. 2. Rã-touro. 3. Parâmetros hematológicos. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.94:574.64

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

*O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos.  
(Oliver Wendell Holmes)*

*DEDICATÓRIA*

*Aos meus pais, Thereza e Donato por tudo que fizeram por mim.*

*Ao João, meu companheiro, meu amor, meu amigo, que sempre  
esteve ao meu lado em todos os momentos.*

*Aos meus tios, Hélio e Nina“ in memorian” pelo apoio e incentivo.*

*Às minhas “filhinhas” Juju e Taruga pela companhia fiel.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por ter me dado forças para enfrentar todas as adversidades encontradas.*

*À Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva pela orientação e paciência.*

*À Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini pelo apoio e incentivo para conclusão desta tese.*

*À Dra. Cláudia Maris Ferreira pelo incentivo, amizade e exemplo de profissionalismo.*

*Ao Dr. Alexandre Firmo de Souza Cruz, pelas palavras de apoio e incentivo.*

*À minha amiga Ângela M. A. Vitiello, que mesmo distante, esteve ao meu lado, lembrando sempre que “o copo sempre está meio cheio”.*

*À minha amiga Rose “Tuca”, pelos nossos 28 anos de amizade.*

*À Cris e à Márcia pelos bons momentos ao longo destes anos.*

*Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin e ao Rogério, do Departamento de Ciências Exatas da FCAV – UNESP Jaboticabal, pelo auxílio nas análises estatísticas.*

*Ao Márcio R. Reche, funcionário do Ranário Experimental pelo auxílio na condução desse experimento e de tantos outros ao longo da minha vida acadêmica.*

*Ao Valdecir Fernandes de Lima, funcionário do Setor de Carcinicultura, pelo auxílio nas análises de água.*

*Aos estagiários do Instituto de Pesca: Fernanda, Patrícia, Danielle e Eduardo pelo auxílio no laboratório e também a todos que de alguma forma auxiliaram na condução do experimento.*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7. ANEXOS	92

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de *Rana catesbeiana* 19
- Figura 2** - Modelo empregado nos testes de toxicidade aguda com zinco, na Unidade Laboratorial Referencial de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA) do Instituto de Pesca, São Paulo – SP 24
- Figura 3** - Teste de toxicidade crônica com zinco realizado na Unidade Laboratorial Referencial de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA), do Instituto de Pesca, São Paulo – SP 26
- Figura 4** - Coleta de sangue através de punção caudal em girinos de *Rana catesbeiana*, utilizados nos testes com sulfato de Cu e sulfato de Zn 28
- Figura 5** - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em 96 horas expostos ao sulfato de cobre 31
- Figura 6** - Valores médios de hematócrito, taxa de hemoglobina e número de eritrócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre 37
- Figura 7** - Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) CM de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre 38
- Figura 8** - Valores médios do número de células imaturas de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre 42
- Figura 9** - Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre 42
- Figura 10** - Valores médios do numero de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre 45
- Figura 11** - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em 96 horas expostos ao sulfato de zinco 47

<b>Figura 12</b> - Valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de zinco	52
<b>Figura 13</b> - Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de zinco	53
<b>Figura 14</b> - Valores médios do número de células imaturas de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de zinco	55
<b>Figura 15</b> - Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de zinco	55
<b>Figura 16</b> - Valores médios do numero de leucócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de zinco	58
<b>Figura 17</b> - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , em 96 horas expostos ao cobre + zinco	60
<b>Figura 18</b> - Valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco	65
<b>Figura 19</b> - Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco	66
<b>Figura 20</b> - Valores médios do número de células imaturas de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco	68
<b>Figura 21</b> - Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco	68
<b>Figura 22</b> - Valores médios do numero de leucócitos de girinos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , expostos a diferentes concentrações de cobre e zinco	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Concentrações de Cu, Zn e Cu + Zn utilizadas nos testes definitivos de toxicidade aguda com girinos de <i>Rana catesbeiana</i>	22
<b>Tabela 2 -</b>	Porcentagens médias de mortalidade cumulativas obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de cobre com girinos de rã-touro	31
<b>Tabela 3 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre	36
<b>Tabela 4 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células imaturas e de trombócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre	41
<b>Tabela 5 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre	44
<b>Tabela 6 -</b>	Porcentagens médias de mortalidade cumulativas obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de cobre com girinos de rã-touro	46
<b>Tabela 7 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de zinco	51
<b>Tabela 8 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células imaturas e de trombócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de zinco	54
<b>Tabela 9 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre e zinco	57
<b>Tabela 10 -</b>	Porcentagens médias de mortalidade cumulativa obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de Cu + Zn com girinos de rã-touro	59
<b>Tabela 11 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre + zinco	64
<b>Tabela 12 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células imaturas e de trombócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre + zinco	67
<b>Tabela 13 -</b>	Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de rã-touro, <i>Rana catesbeiana</i> , exposto a diferentes concentrações de cobre e zinco	70

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do cobre, do zinco e da associação entre cobre e zinco (1:1) sobre os parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, através de testes de toxicidade aguda e crônica com girinos expostos a estes metais. Através dos testes de toxicidade aguda, determinou-se a  $CL_{50(96h)}$  (concentração letal média) do cobre, que foi de 2,20 mg/L, do zinco 2,78 mg/L e do cobre associado ao zinco 1,90 mg/L. A partir dos dados obtidos nos testes de toxicidade aguda, realizaram-se os testes de toxicidade crônica em três concentrações ( $CL_{50}$ ,  $CL_{50/10}$  e  $CL_{50/100}$ ) e um grupo controle (0 mg/L). Foram realizadas três coletas de sangue dos girinos, através de punção do vaso caudal, no momento zero (basal), aos 7 dias e aos 14 dias. A análise das células sanguíneas foi realizada através dos parâmetros hematológicos: hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem total de leucócitos, contagem de trombócitos, contagem de células vermelhas imaturas e contagem diferencial de leucócitos, classificando-os em linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda mostram uma maior sensibilidade dos girinos expostos ao cobre associado ao zinco, em virtude do valor da  $CL_{50}$  ser de 1,90 mg/L, inferior ao valor da  $CL_{50}$  do cobre, que foi de 2,20 mg/L e do zinco, que foi 2,78 mg/L. A variação dos parâmetros hematológicos nos três testes de toxicidade crônica apresentou comportamento semelhante, sem evidências de um maior efeito tóxico sobre os animais expostos ao cobre associado ao zinco.

## ABSTRACT

The aim of this paper was evaluate the effects of copper, zinc and copper associated to zinc (1:1) in hematological parameters of bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*, by tests of acute and chronic toxicity of tadpoles exposed to this metals. In the acute toxicity tests, the 96h-LC50 (median lethal concentration) of copper was 2,20 mg/L, of zinc 2,78 mg/L and of copper associated to zinc 1,90 mg/L. After the acute toxicity tests, was realized the chronic toxicity tests with three concentrations (CL<sub>50</sub>, CL<sub>50</sub>/10 and CL<sub>50</sub>/100) and a control group (0 mg/L). Three collects of tadpole blood were realized by punching tale vases in the zero moment, on the 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day. Blood cells analysis was realized through hematological parameters: hematocrit (Ht), hemoglobin rate (Hb), number of erythrocytes (Er), corpuscular volume medium (VCM), corpuscular hemoglobin medium (HCM), corpuscular hemoglobin concentration medium (CHCM), leucocytes total count, trombocytes count, immature red cells count and leucocytes differential count, classing in lymphocytes, monocytes, neutrofyles, basophiles and eosinofilies. The results obtained in acute toxicity tests showed a higher sensibility of bullfrog tadpoles exposed to copper associated with zinc, by the LC50 1,90 mg/L Cu+Zn be lowest to LC50 of copper (2,20 mg/L) e LC50 of zinc (2,78 mg/L). Hematological parameters variations in the three chronic toxicity tests showed similar behave, without bigger toxic effect on tadpoles exposed to copper associated with zinc.

## ***1. INTRODUÇÃO***

### ***1.1. Caracterização da ranicultura***

A *Rana catesbeiana*, de origem norte-americana, pertence à classe Amphibia e à família Ranidae. Introduzida no Brasil em 1935, expandiu-se por todo território, onde encontrou ótimas condições para seu desenvolvimento, apresentando excelentes qualidades adaptativas ao clima tropical, com desempenho muito superior ao do seu país de origem, sendo a única espécie criada em cativeiro no Brasil (FONTANELLO et al., 1988).

A criação de rã-touro no Brasil desperta enorme interesse junto a produtores, investidores e grandes empresas, devido ao seu elevado potencial reprodutivo, à eficiência de sua conversão alimentar e ao bom retorno financeiro com a venda de sua carne e outros subprodutos para os mercados interno e externo. Sua carne é bastante apreciada por possuir excelente sabor, aliada ao fato de apresentar qualidades nutricionais, tais como a elevada presença de sais minerais e baixo teor de gordura (LIMA e AGOSTINHO, 1989).

### ***1.2.. Escolha do material biológico***

Os anfíbios são utilizados como bioindicadores de poluição ambiental por exercerem importante papel nos ecossistemas aquáticos, por terem seu ciclo de vida na água, quando girinos e na água e na terra após sofrerem metamorfose (GREENHOUSE, 1976; SCHUYTEMA et al., 1991; BUENO-GUIMARÃES et al., 2001; BURGER e SNODGRASS, 2001; FERREIRA, 2002; FERREIRA et al., 2004).

A manutenção destes animais em laboratório é facilitada pelo seu tamanho, uma vez que os girinos são mantidos em aquários, normalmente na densidade de um animal

por litro de água. Além disso, são de fácil manipulação para realização de análises laboratoriais.

Em diferentes ambientes, a poluição pode causar em anfíbios alterações na densidade populacional (FELLERS e DROST, 1993), mutações (KRAUTER et al., 1987; KRAUTER, 1993) e má formações (LOU et al., 1993; BANTLE et al., 1994; MORGAN et al., 1996), além de alterações do material genético, evidenciado pelo teste do micronúcleo, como foi realizado por FERREIRA (2002) e FERREIRA et al. (2003).

### ***1.3. Toxicidade de metais pesados***

Muitas substâncias tóxicas afetam a vida aquática, entre elas os metais pesados, ácidos, álcalis e pesticidas. Os metais pesados, como por exemplo, o cobre e o zinco, podem se tornar letais devido à capacidade que possuem de formarem compostos estáveis que podem permanecer na cadeia alimentar, afetando os ecossistemas aquáticos. Provocam desde uma discreta, porém contínua, redução nas taxas de crescimento e reprodução e um aumento da taxa de mortalidade até a eliminação completa da biota (MAZON et al., 2000).

Segundo MURTY (1988), o processo de assimilação dos metais pesados é influenciado por vários fatores, tais como a forma química do metal na água (solúvel ou particulado), as condições físicas e químicas do meio aquático (temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido) e o próprio animal (estágio de desenvolvimento, idade e tamanho, atividade, período do ciclo reprodutivo).

Um critério para proteção da biota aquática em relação aos níveis de metais é a estimativa de concentrações seguras, isto é, concentrações que permitem a

sobrevivência, crescimento e reprodução dos animais. Essas concentrações são calculadas em experimentos com variáveis altamente controladas (MAZON et al., 2000).

Os produtos à base de cobre e zinco podem ingressar no ecossistema aquático de maneira indireta através de sua utilização na agricultura. Podem, também, atingir os ecossistemas aquáticos por meio da erosão do solo, pelo vento, deriva no ato da pulverização dos agrotóxicos, escoamento de água de chuva e contaminação dos lençóis freáticos.

#### **1.4. Efeitos do cobre**

O cobre tem particular relevância no equilíbrio dos sistemas aquáticos e pode colocar em risco a vida dos organismos que habitam esse meio. Apesar de ser considerado um elemento-traço fundamental para algumas atividades celulares da comunidade aquática, o cobre pode tornar-se tóxico e, dependendo da sensibilidade do organismo, pode causar mortalidade ou estresse sub-letal, reduzindo a capacidade dos organismos aquáticos em competirem efetivamente no seu habitat (MAZON et al., 2000).

O efeito tóxico do sulfato de cobre na comunidade aquática varia enormemente entre os organismos, dependendo da sensibilidade, estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, atividade, ciclo reprodutivo e status nutricional do organismo exposto (PELGROM, 1994). Além disso, em ecossistemas aquáticos, o cobre pode ser encontrado nas formas particulada, coloidal e solúvel. A toxicidade desse elemento para organismos aquáticos depende da concentração de íons livres de cobre ou de ligações com os grupos dos carbonatos, nitratos, sulfatos, cloretos, nitrogênio amoniacal, hidróxidos e materiais orgânicos, como por exemplo, os ácidos húmicos. Na maioria das vezes, é influenciada pelas características físicas e químicas da água (MAZON et al., 2000).

O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) é um produto de grande aplicabilidade em sistema de cultivos de rãs e peixes, sendo utilizado para redução da abundância de fitoplâncton, controle de parasitoses e de enfermidades de origem bacteriana (BOYD e TUCKER, 1998). Além disso, muitos criadores têm utilizado o sulfato de cobre para o tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias, platelmintos e nematódeos ectoparasitas, ou, ainda, como tratamentos profiláticos (CARDEILHAC e WHITAKER, 1988; FERREIRA et al., 2004).

A contaminação por cobre em organismos aquáticos, leva a complicações respiratórias (ERIKSSON e WEEKS, 1994) e também altera o transporte na membrana celular e as funções mitocondriais (REDDY e BHAGYALAKSHMI, 1994).

LAURÉN e McDONALD (1986) relataram que a toxicidade do cobre é altamente dependente da alcalinidade e do pH do meio. A dureza da água interfere na toxicidade das substâncias porque a concentração de cátions polivalentes reduzem a biodisponibilidade dos metais tóxicos. Em pH baixo os metais tornam-se mais biodisponíveis.

O  $\text{CuSO}_4$  é utilizado contra estratificação da água e controle do “bloom algal”, porém pode apresentar efeitos negativos. Se houver acúmulo de matéria orgânica no sedimento, pode estimular o metabolismo microbiano e provocar a eliminação do oxigênio dissolvido (HANSON e STEFAN, 1984).

Contudo, sabe-se que a concentração total de cobre e de outros metais pesados no ambiente, quer seja na água ou no sedimento, não é indicação dos seus efeitos biológicos potenciais, visto que apenas uma pequena fração presente no ambiente aquático fica biodisponível para ser absorvida pela comunidade aquática (MACKAY e FRASER, 2000). É bem conhecido o fato de que o sedimento tem um importante papel

na retenção de nutrientes, o que contribui também para atenuar o impacto das atividades antropogênicas nos ambientes aquáticos (ARREGHINI et al., 2001).

O cobre em excesso pode alterar ou inibir vários passos do processo reprodutivo (BILLIARD et al., 1981), provocar deformidades vertebrais (BENGTSSON e LARSSON, 1986), inibir a atividade de enzimas específicas (LORZ e McPHERSON, 1976), aumentar o consumo de oxigênio (O'HARA, 1971) e provocar alterações histológicas no fígado, no rim e nas brânquias (BAKER, 1969). Além disso, produz hemólise pelo aumento da oxidação do grupo sulfídrico da hemoglobina, conduzindo a um aumento da permeabilidade de células vermelhas do sangue (FRIBERG et al., 1986). Por outro lado, em caso de déficit de cobre, haverá falhas estruturais no colágeno e na elastina, problemas de plasticidade e solidez dos tecidos (BAKER, 1969).

MAZON (1997), em um estudo sobre bioacumulação de cobre, constatou que o íon cobre acumula-se nas brânquias, no fígado, no rim, no intestino e no estômago de curimatá (*Prochilodus scrofa*) quando expostos às concentrações de 0,025 e 0,029 mg/L durante 96 h.

Além das brânquias, outra importante via de absorção do cobre nos organismos aquáticos é por meio da ingestão de alimentos contendo concentrações elevadas desse composto (MACKAY e FRASER, 2000).

O acúmulo de cobre nos tecidos tem relação direta com a concentração de cobre no meio aquático (MAZON et al., 2000; DIAS, 2003), conforme tem sido observado em diversas espécies de peixes (YAMAMOTO et al., 1977; PELGROM et al., 1995) e em girinos de *Rana catesbeiana* (LOMBARDI et al., 1999; FERREIRA, 2002; FERREIRA et al., 2004) expostos ao cobre dissolvido na água. Já em espécies de peixes, o rim e o fígado são os locais de maior acumulação (MAZON et al., 2000).

ZAGATTO (1995) observou acúmulo de cobre nas vísceras de *Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticus*, coletados na represa de Guarapiranga. VARANKA (2001) verificaram que o acúmulo de cobre no fígado de carpas (*Cyprino carpio*) foi 25 vezes maior que no do grupo-controle, após 24 horas de exposição e 37 vezes maior, após 48 horas.

Adultos de da espécie de peixe *Solea senegalensis* foram expostos a dose sub-letal de cobre por sete dias e após isso, mantidos por quatro dias sem exposição ao cobre (período de depuração). Os níveis de cobre nas brânquias e no fígado aumentaram durante a exposição sub-letal. Durante o período de depuração, a concentração de cobre reduziu nas brânquias e no fígado (ARELLANO et al., 1999), indicando que este metal é eliminado com certa facilidade dos organismos a ele expostos.

Apesar da tolerância ao cobre em água ser relativamente alta, é dependente da classificação das águas quanto ao seu uso (CONAMA, 2005).

### **1.5. Efeitos do zinco**

A ação nociva de alguns sais metálicos é nitidamente interna ou intracelular, porém a dos metais pesados, conhecidos pela sua elevada toxicidade, parece ser principalmente externa. Metais como o zinco e o cobre provocam a coagulação do muco sobre as brânquias dos peixes, causando sua asfixia. Esta constitui uma das causas mais freqüentes de intoxicação de peixes em rios de zonas agrícolas (BRANCO, 1970). Em girinos, devido à ausência de brânquias externas, a formação de muco sobre a pele do animal prejudica a oxigenação, já que em girinos ocorre troca via dérmica, que representa 30% do total da respiração (STORER e USINGER, 1979; LIMA e AGOSTINHO, 1989).

Segundo AHSANULLAH e YING (1995), o zinco, como o cobre, são metais essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos organismos. Porém, estes podem ser

extremamente tóxicos quando em altas concentrações no ambiente. O zinco é um elemento-traço essencial para todos os seres vivos em muitas atividades bioquímicas celulares (HERKOVITS e HELGUEIRO, 1998), tendo importante papel no crescimento, desenvolvimento e função de todas as células vivas. Sendo um micronutriente, atua como co-fator em várias metaloenzimas e proteínas reguladoras, incluindo a biossíntese e reparo do DNA e RNA (BRZÓSKA e MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001). Foi demonstrado que ele exerce papel imunestimulador, atuando na atividade dos glóbulos brancos produtores de anticorpos e de outras células fagocitárias e, que o déficit de zinco induz numerosas alterações no sistema imunológico.

A toxicidade do zinco depende também das condições físicas e químicas do meio e do organismo a ele exposto. Entretanto, algumas espécies de peixes mostram reações fisiológicas de estresse quando expostos a concentrações sub-letais de sulfato de zinco (SPRAGUE, 1968). Além disso, o zinco pode afetar o estabelecimento de hierarquias dominantes (HENRY e ATCHISON, 1979).

Embora o zinco em elevadas concentrações possa causar danos aos organismos aquáticos, deve-se levar em consideração que em lagos naturais há presença de sedimento, pois neste compartimento o zinco se associa com a matéria orgânica nele depositada, aumentando a formação de complexos, ficando menos disponível na água, o que reduz a sua ação tóxica aos organismos (ARREGHINI et al., 2001). Entretanto, animais que têm o hábito de se alimentarem junto ao sedimento estarão mais propensos à ação tóxica deste metal.

CUVIN-ARALAR (1994) observou que duas linhagens de *O. niloticus*, quando expostas a 1,0 mg/L de zinco, nas mesmas condições, por 14 dias, bioacumularam concentrações distintas desse metal-traço. Enquanto que a primeira linhagem acumulou

178  $\mu\text{g Zn/g}$  de matéria seca, a segunda acumulou 195,3  $\mu\text{g Zn/g}$  de matéria seca, mostrando influência da linhagem sobre a toxicidade.

### **1.6. Cobre associado ao zinco**

Um fenômeno que ocorre entre o cobre e o zinco é a adsorção competitiva, ou seja, ambos competem pelo mesmo sítio ativo, ocorrendo inibição da absorção de zinco quando há presença de cobre. Isso ocorre principalmente quando há grande quantidade de matéria orgânica no meio (TOMAZELLI, 2003).

A adsorção pode ser definida como o acúmulo de um determinado elemento ou substância na interface entre a superfície sólida e a superfície adjacente.

Na agricultura, utiliza-se freqüentemente uma pasta fúngica à base de cobre (oxicloreto de cobre, óxido cuproso ou sulfato de cobre) e zinco (mancozeb, dithane ou manzate) ambos a 5% (5g do produto comercial/litro de água) ou ainda a solução de cobre a 5% acrescida de 50g de ácido bórico e 250g de sulfato de zinco (POLTRONIERI et al., 2002). Porém, sabe-se que a adição de zinco ao cobre, pode potencializar o efeito tóxico deste último elemento.

### **1.7. Testes de toxicidade aguda**

A toxicidade aguda de um composto químico é expressa pela quantidade necessária deste composto, para provocar a morte de 50% de um lote de animais expostos, em condições padronizadas, em testes de laboratório. É representada pela sigla  $DL_{50}$  (Dose Letal Média), utilizada no caso de ingestão do agente tóxico ou  $CL_{50}$  (Concentração Letal Média), utilizada no caso de exposição ao agente tóxico. Para bioensaios de  $DL_{50}$  ou  $CL_{50}$  são selecionadas, pelo menos, quatro doses crescentes do

composto químico de tal maneira que a menor dose não provoque mortalidade nos animais do grupo e a maior dose provoque 100% de mortes (LARINI, 1970).

Os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre organismos aquáticos, pois compreendem análises experimentais de curta duração (entre 24 e 96 h) (LOMBARDI, 2004).

### **1.8. Testes de toxicidade crônica**

Além da toxicidade aguda, os organismos aquáticos podem sofrer efeitos crônicos quando expostos a baixas concentrações ou concentrações sub-letais de agentes tóxicos por longo período de tempo.

Testes de toxicidade crônica são experimentos de longa duração, que visam o estudo dos efeitos não letais de agentes tóxicos. Estes efeitos são geralmente avaliados através de exposições prolongadas dos organismos a concentrações sub-letais, que são estimadas, principalmente através de testes preliminares (LOMBARDI, 2004).

BASSOI et al. (1990) propuseram uma metodologia que vem sendo bastante utilizada no estabelecimento das concentrações ideais para a condução dos testes de toxicidade crônica. Trata-se de uma estimativa das concentrações de efeito não observado (CENO) obtido a partir das concentrações letais, determinadas em testes de toxicidade aguda e calculadas através dos seguintes quocientes:  $CL_{50}/10$  e  $CL_{50}/100$  (LOMBARDI, 2004).

De maneira geral, os efeitos crônicos mais comuns nos organismos aquáticos são mudanças comportamentais como natação errática, diminuição da relação presa-predador, alterações fisiológicas, crescimento retardado, alterações bioquímicas e histológicas (BOOCK, 2000), além da incapacidade dos organismos expostos produzirem proles viáveis (RAND e PETROCELI, 1985).

### 1.9. Parâmetros hematológicos

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue e, grande parte das informações, consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais e anormais. A aplicação da hematologia em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

O sangue, um tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo, está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (KALASHNIKOVA, 1976). Distribui calor, transporta gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

O sangue dos anfíbios é característico dos vertebrados não mamíferos, sendo sua porção figurada composta por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (DODD e DODD, 1976; NAOUM et al., 1986; DIAS, 1989).

Segundo DIAS (1992), em termos quantitativos, o número de células do sangue de *Rana catesbeiana* apresenta sensíveis variações em função do sexo, espécie, fases da metamorfose, estado nutricional, atividade sexual, estação climática e temperatura.

Os exames normalmente utilizados para as pesquisas hematológicas dizem respeito aos aspectos morfológicos, funcionais e proporcionais das células vermelhas (determinação do número de eritrócitos, da taxa de hemoglobina, do hematócrito e cálculo dos índices hematimétricos absolutos), dos trombócitos (número absoluto) e dos glóbulos brancos (contagem total e diferencial de leucócitos).

As células que comumente ocorrem no sangue periférico de anfíbios são:

### Eritrócitos

Os eritrócitos dos anfíbios são células geralmente elípticas com núcleo central. Variam muito de tamanho entre as espécies. Nos anuros o citoplasma das células vermelhas é homogêneo e carrega em seu interior a hemoglobina. As organelas, tais como lisossomas e mitocôndrias são raras (TURNER, 1988).

Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue. A função dessas células consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico, desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

A função da hemoglobina é transportar o  $O_2$  e parte do  $CO_2$  no sangue. Qualquer deficiência no eritrócito e, conseqüentemente na hemoglobina, será traduzida por uma falta de  $O_2$  nos tecidos. É importante destacar que a forma do eritrócito e sua extrema plasticidade favorecem sua circulação nos capilares e, assim, qualquer modificação na forma acarretará perturbação circulatória e favorecerá a sua destruição (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Em uma dada espécie, a maioria dos eritrócitos possui, normalmente, a mesma coloração e o mesmo diâmetro. Em estados patológicos, no entanto, podem ocorrer anomalias importantes, com relevante significado diagnóstico. Entretanto, grande número de eritrócitos, com citoplasma acinzentado e características de células imaturas (eritroblastos), ocorre normalmente no sangue periférico de peixes e anfíbios. Tal fato deve ser interpretado com certo cuidado, uma vez que nas séries sangüíneas existe um equilíbrio, com as formas mais maduras correspondendo às mais numerosas. A quebra desse equilíbrio pelo excesso de formas imaturas sugere a existência de uma perturbação na maturação destas células ou perdas excessivas, como nas hemorragias, por exemplo (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Em hematologia são utilizados três índices hematimétricos calculados a partir do número de eritrócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue, da taxa de hemoglobina e da relação glóbulo-plasmático (hematócrito). São eles: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O Volume Corpuscular Médio (VCM), que expressa o volume médio dos eritrócitos em fentolitro (fL, anteriormente usado  $\mu^3$ ), é maior em peixes, anfíbios, répteis e aves do que em mamíferos, devido à presença de núcleo dessas células daqueles animais (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

O HCM indica o peso médio de hemoglobina por eritrócito, em picograma (pg/cel). WINTROBE (1934) comparou valores hematológicos de vários vertebrados e observou variações de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), sendo que as células maiores possuíam maior quantidade de hemoglobina. Por outro lado, as variações dos valores de HCM eram inversas às do número de eritrócitos/ $\text{mm}^3$  de sangue, mantendo a concentração de Hb no sangue total relativamente constante.

CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), indica o valor médio da porcentagem em peso da hemoglobina por eritrócito e varia pouco entre as espécies.

Esses índices são utilizados na caracterização morfológica do sangue dos animais e das anemias.

### **Trombócitos**

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de anfíbios são células completas. Ao microscópio de luz comum são células predominantemente elípticas, arredondadas ou fusiformes, com núcleo fusiforme e hipercondensado (PENHA et al., 1996). Quando se encontram na forma

arredondada são facilmente confundidos com os linfócitos. Por essa razão e pela sua capacidade de adesão e propriedade de agregação que causam sua distribuição aleatória nas extensões, a contagem de trombócitos é bastante complicada. Algumas vezes o citoplasma é escasso ou pobremente corado com corantes ácido-básico, não sendo possível sua observação. Outras vezes pode ser hialino ou levemente acidófilo, diferente do observado em linfócitos. Porém, quando corados com solução de azul de toluidina, seu citoplasma pode ser melhor observado (TURNER, 1988).

Ultraestruturalmente, os trombócitos apresentam formas variadas, semelhantes àquelas descritas em microscopia comum. O contorno citoplasmático é de maneira geral regular, ocasionalmente possui invaginações e prolongamentos digitiformes. Raramente observa-se complexo de Golgi definido mas sim vacuolização, o que o difere dos linfócitos (RIBEIRO, 1978). A atividade fagocitária em trombócitos foi descrita em anfíbios (DIAS e SINHORINI, 1991; PENHA et al., 1996), répteis (PELLIZZON e LUNARDI, 2000), aves (CHANG e HAMILTON, 1979, GRECCHI et al., 1980; Da MATTA et al., 1998 e 1999) e peixes (MORROW e PULSFORD, 1980 e SUZUKI, 1986). Um aspecto distinto dos trombócitos de anfíbios é a presença de grânulos uniformes, esféricos e azurófilos dentro do citoplasma, que podem assumir distribuição bipolar ou difusa (PENHA et al., 1996).

A função e a ocorrência de trombócitos ainda permanece controversa. Os trombócitos têm sido geralmente considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (GARDNER e YEVICH, 1969; CASILLAS e SMITH, 1977), desempenhando papel análogo às plaquetas (PENHA et al., 1996) e apresentam ultra-estrutura semelhante à das plaquetas dos mamíferos (MORROW e PULSFORD, 1980).

Em anfíbios, estas células possivelmente têm papel na fagocitose de corpos estranhos em salamandra e sapo leopardo (PENHA et al., 1996). Em girinos de *Rana*

*catesbeiana*, os trombócitos podem ser as maiores células inflamatórias (DIAS e SENHORINI, 1991).

Em mamíferos, não observa-se trombócito nas reações inflamatórias induzidas por corpos estranhos (PENHA et al., 1996).

### **Leucócitos**

Embora haja extensa literatura especializada sobre a morfologia dos leucócitos, a classificação dos mesmos não é uniforme. Isto pode ser explicado pelo grande número de variedades leucocitárias no sangue periférico e pelos vários graus de ontogênese, o que causa, freqüentemente, grandes problemas na comparação dos resultados obtidos para uma mesma espécie (RANZANI-PAIVA, 1995).

Leucócitos imaturos resultam de estímulos externos e internos, segundo JAKOWSKA (1959). Esses leucócitos podem variar de tamanho, podendo assemelhar-se a linfócitos ou pequenos monócitos e apresentam citoplasma de coloração intensamente basofílica. Os leucócitos imaturos recebem diferentes denominações, entre elas, hemoblastos (PANDEY e PANDEY, 1977), células blásticas (HINES e YASHOUV, 1970; BLAXHALL e DAISLEY, 1973), hemoblastos linfóides (RIBEIRO, 1978; BOOMKER, 1980; BARBER e WESTERMANN, 1981) e células imaturas (TAVARES-DIAS et al., 2001; RANZANI-PAIVA e ISHIKAWA, 1996; RANZANI-PAIVA et al., 1998, 1998/1999 e 2000).

Diversos corantes panóticos podem ser utilizados na coloração de extensões sangüíneas de anfíbios para identificação e/ou contagem diferencial de leucócitos a exemplo de outros vertebrados. Na literatura internacional o Giemsa ou Giemsa-May-Grünwald são os corantes comumente usados e na literatura nacional, é o corante preconizado por ROSENFELD (1947). Porém, muitas vezes o corante de rotina

empregado com sucesso na coloração das extensões de determinada espécie precisa ser modificado para que se obtenha bons resultados em outras (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Os principais leucócitos encontrados em sangue periférico de *Rana catesbeiana* são:

### **Linfócitos**

Sob microscopia comum, os linfócitos são células predominantemente arredondadas, de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, com ou sem indentação, acompanha o formato da célula, apresenta cromatina compactada, mas não tem nucléolos sendo elevada relação núcleo/citoplasma (TURNER, 1988). Os linfócitos, em geral, apresentam projeções citoplasmáticas, o que facilita diferenciá-los dos trombócitos nas extensões sangüíneas. Tais projeções também foram descritas em outros estudos de microscopia comum (WILLIAM e WARNER, 1976) e de microscopia eletrônica de transmissão (BLAXHAL, 1983; FUJIMAKI e ISODA, 1990).

O citoplasma é fortemente basofílico e pode conter grânulos azurófilos próximos ao núcleo. Geralmente são observados linfócitos grandes e pequenos (VEIGA et al., 2000). Linfócitos pequenos são constituintes particularmente comuns em sangue e tecido linfóide de anfíbios, mas as formas grandes também ocorrem (TURNER, 1988).

Os linfócitos produzem anticorpos e estão relacionados ao processo de rejeição, participando do processo inflamatório (FINN e NIELSON, 1971; MacARTHUR et al., 1984; TURNER, 1988).

## **Monócitos**

Os monócitos são células grandes, arredondadas, com citoplasma basofílico apresentando vacuolização. O núcleo é excêntrico, arredondado ou indentado, com cromatina compacta (TURNER, 1988).

São consideradas verdadeiras células em trânsito no sangue periférico (LORENZI, 1999). Do sangue periférico migram para o foco inflamatório e transformam-se em macrófagos (RANZANI-PAIVA e SOUZA-SILVA, 2004). Sob condições apropriadas, estas células deixam o sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (MORROW e PULSFORD, 1980; BOOMKER, 1981; FULOP e McMILLAN, 1984 e MATUSHIMA e MARIANO, 1996).

**Segundo alguns autores, monócitos são células parcialmente diferenciadas e apresentam moderada propriedade fagocítica (THUVANDER et al., 1987 e DOGGET et al., 1987).**

Sumarizando, o critério para definir monócito e macrófago é a ávida fagocitose e suas localizações teciduais. O termo monócito é preferido aqui, de acordo com a definição de fagócito mononuclear de van FURTH et al. (1972): macrófago é aplicado para células teciduais e monócito, para seus precursores circulantes.

## **Granulócitos**

Em anfíbios, pode-se reconhecer os mesmos granulócitos que ocorrem em outros vertebrados. Os granulócitos apresentam atividades fagocitárias, estando intimamente relacionados com os mecanismos de defesa do hospedeiro, particularmente contra bactérias. São considerados como granulócitos células denominadas de neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

**Neutrófilos**

Os neutrófilos são células arredondadas, de tamanho semelhante ao dos monócitos. A cromatina nuclear é compacta e não são evidenciados nucléolos. São chamados de polimorfonucleares, devido à grande variação de formas de seu núcleo excêntrico, que pode apresentar-se em bastonete ou com várias segmentações. O citoplasma dos neutrófilos dos anfíbios apresenta grânulos pequenos quando comparados aos dos outros vertebrados que variam de tamanho, de forma e sub-estruturas, dentro e entre as espécies (TURNER, 1988).

Os neutrófilos representam a primeira defesa contra os microorganismos, sendo células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções (THUVANDER et al., 1987; TURNER, 1988) e possuem um sistema de agentes microbicidas.

**Eosinófilos**

Estas células têm tamanho variado e núcleo arredondado e excêntrico. O citoplasma é abundante e rico em grânulos grosseiros com coloração rosa-alaranjada (grânulos eosinofílicos). São células menos frequentes que os neutrófilos. O núcleo tende a ser pouco lobulado e apresenta-se basofílico, com cromatina densa (TURNER, 1988; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Suas principais funções são fagocitar e destruir complexos de antígenos com anticorpos, limitar e circunscrever o processo inflamatório, sendo as últimas a surgir durante o processo inflamatório (SUZUKI, 1986).

**Basófilos**

Os basófilos são células menores que os neutrófilos, com forma arredondada e contorno regular. O núcleo acompanha o formato da célula, apresenta cromatina compactada e não tem nucléolos. O citoplasma apresenta granulações grosseiras

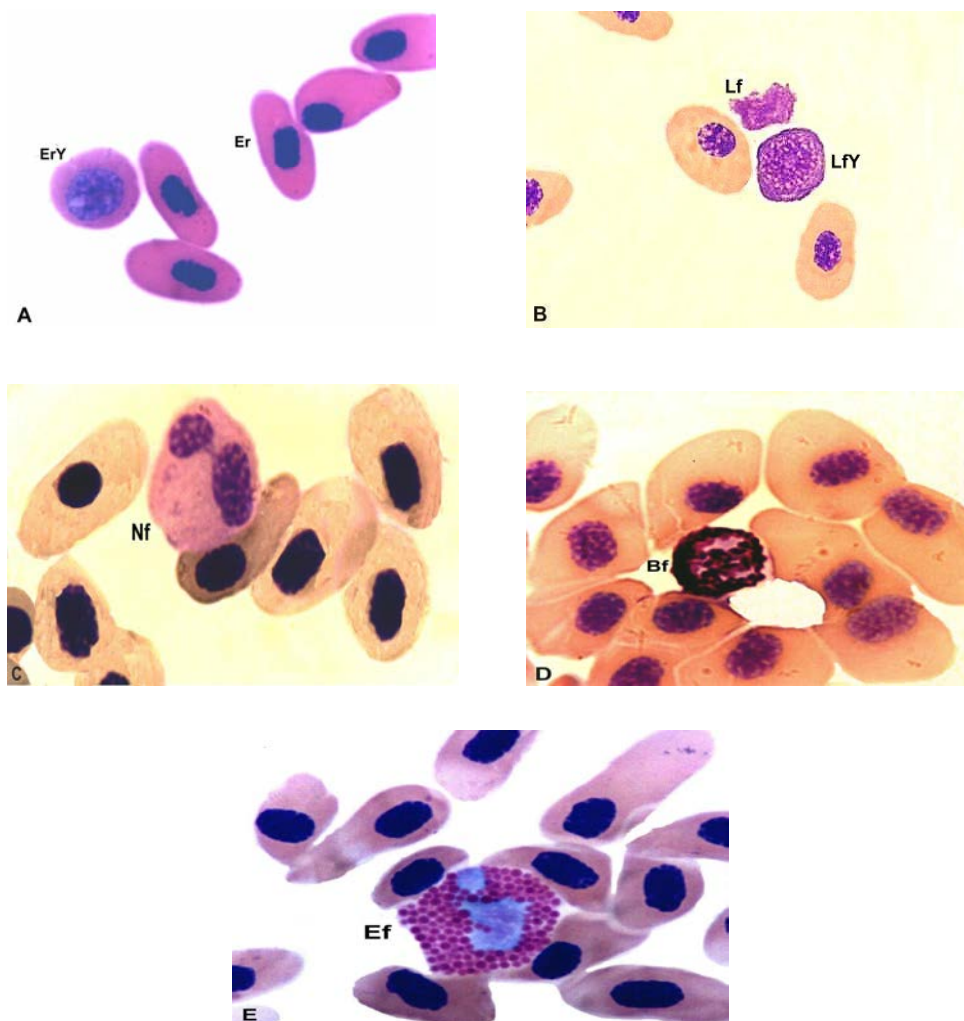
basofílicas, que recobrem o núcleo na maioria das vezes (TURNER, 1988; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Ultraestruturalmente, os basófilos apresentam citoplasma irregular, com grandes projeções citoplasmáticas, granulações esféricas, discreta formação de retículo endoplasmático granular e elevada quantidade de mitocôndrias e ribossomos livres (RIBEIRO, 1978; LÓPEZ-RUIZ et al., 1992). O núcleo apresenta cromatina pouco densa e raramente observa-se nucléolo (RIBEIRO, 1978; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Embora exerçam função fagocítica não o fazem com a mesma avidéz dos neutrófilos. Nos mamíferos, são células derivadas da medula óssea e participam de processos alérgicos e resposta imunológica (LORENZI, 1999). Em peixes, RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004) sugerem que tal granulócito é mais freqüente em portadores de parasitoses, enquanto que ROBERTS (1981) relaciona aos processos alérgicos, por possuírem histamina em seus grânulos. São células particularmente abundantes no sangue periférico de girinos de *R. catesbeiana* (FERREIRA, 2002)

### **Outras células**

Segundo JAKOWSKA (1959), peixes e anfíbios podem, às vezes, conter muitas células imaturas no sangue periférico, como resultado de certos estímulos externos ou internos. Estas células imaturas desaparecem gradualmente pela continuidade do processo de diferenciação nos vasos sanguíneos. Tal poder de diferenciação não ocorre no homem ou em outros mamíferos. Por esta razão, quando no sangue dos anfíbios existem numerosas células imaturas, deduz-se que haja um falso estado leucêmico.



**Figura 1** - Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de *Rana catesbeiana*

A – Er = eritrócito, ErY = eritrócito jovem; B – Lf = linfócito, LfY = linfócito jovem; C – Nf = neutrófilo; D – Bf = basófilo; E – Ef = eosinófilo. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000X

(Fonte: FERREIRA, 2002)

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram determinar, em girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*:

- a  $CL_{50}$  (96 h) do cobre, do zinco e da interação entre o cobre e o zinco, por testes de toxicidade aguda;
- as alterações hematológicas em animais expostos a diferentes concentrações sub-letais de cobre, de zinco e da interação entre o cobre e o zinco em testes de toxicidade crônica.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Locais de realização dos testes e metais utilizados**

Os testes de toxicidade aguda (preliminares e definitivos) com sulfato de cobre e sulfato de cobre adicionado ao sulfato de zinco (1:1) foram conduzidos na sala de bioensaio do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV / UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, com girinos procedentes do Ranário Experimental da FCAV – UNESP Jaboticabal. Os testes de toxicidade aguda com sulfato de zinco foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Unidade Laboratorial de Referência de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA) do Instituto de Pesca, São Paulo – SP, com girinos procedentes do Ranário Ramazon , em Goiânia – GO.

O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e o sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ), são fungicidas inorgânicos, sendo o primeiro pertencente à classe toxicológica IV e o segundo à classe toxicológica III (ANDREI, 1993).

As técnicas para condução dos testes seguiram as recomendações feitas pela American Society for Testing and Materials – ASTM (1980) e American Public Health Association – APHA (1998).

Os testes foram realizados com girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana* no estágio 31 da tabela de GOSNER (1960).

#### **3.2. Toxicidade aguda**

Foram realizados testes preliminares para determinação das concentrações a serem usadas nos testes definitivos. Nos testes definitivos, foram realizados três testes isolados com um grupo controle e três réplicas, conforme descrito a seguir:

1° teste – sulfato de cobre;

2° teste – sulfato de zinco;

3° teste – sulfato de cobre associado ao sulfato de zinco (50%).

A substância química utilizada para os testes com cobre foi obtida a partir do sulfato de cobre e a do zinco a partir do sulfato de zinco. As soluções para realização dos testes preliminares e definitivos foram preparadas com base na análise química dos produtos utilizados, levando-se em consideração o peso molecular dos metais utilizados, de maneira a obter-se as concentrações a serem testadas. As soluções estoque foram preparadas sempre no dia de cada intoxicação. As concentrações utilizadas nos testes definitivos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de Cu, Zn e Cu + Zn utilizadas nos testes definitivos de toxicidade aguda com girinos de *Rana catesbeiana*

Tratamentos	Cobre	Zinco	Cobre + Zinco
Controle	0 mg/L	0 mg/L	0 mg/L
T1	0,5 mg/L	2,0 mg/L	0,5 mg/L + 0,5 mg/L
T2	1,0 mg/L	3,0 mg/L	1,0 mg/L + 1,0 mg/L
T3	2,0 mg/L	4,0 mg/L	1,5 mg/L + 1,5 mg/L
T4	3,5 mg/L	-	2,0 mg/L + 2,0 mg/L
T5	-	-	2,5 mg/L + 2,5 mg/L
T6	-	-	3,0 mg/L + 3,0 mg/L
T7	-	-	3,5 mg/L + 3,5 mg/L

**T1 = tratamento 1; T2 = tratamento 2; T3 = tratamento 3; T4 = tratamento 4; T5 = tratamento 5; T6 = tratamento 6; T7 = tratamento 7**

### 3.3. Aclimação dos animais

Para os três experimentos, cerca de 1.500 girinos (500 por experimento) foram estocados na densidade de um exemplar para cada litro de água em reservatórios de 250L, dotados de sistema de aeração e localizados em sala climatizada, com controle de temperatura ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12:12), como recomendado por MURTY (1988).

Antes do início dos testes, os girinos foram medidos com régua com precisão de 1 mm e pesados em balança digital com precisão de 0,001g, apresentando comprimento inicial médio de  $5,58 \pm 0,08$ cm e peso inicial médio de  $3,31 \pm 0,08$ g.

Utilizou-se água de abastecimento urbano, declorada por pernoite. Antes de sua utilização, a água era submetida a um teste a fim de verificar-se a presença de cloro residual. O período de aclimação foi de 96 horas. Diariamente promovia-se a renovação de 50% do volume de água do reservatório a fim de manter a qualidade física e química da água em condições aceitáveis para sobrevivência destes animais (FERREIRA et al., 2003).

A alimentação dos girinos durante este período foi ração farelada com 42% de proteína bruta, na quantidade de 2% da biomassa do tanque por dia (LIMA e AGOSTINHO, 1989). Os restos de alimentos e fezes foram removidos diariamente por sifonagem e o volume de água sifonado foi repostado em seguida. A alimentação foi interrompida 24 horas antes do início dos testes.

### **3.4. Condução dos testes**

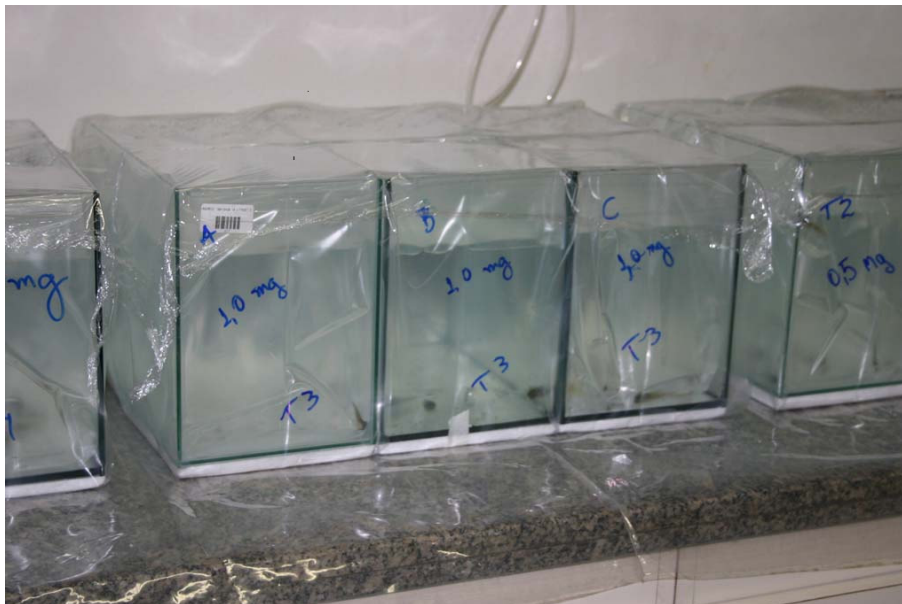
Os recipientes-teste utilizados nos experimentos definitivos foram aquários de vidro com oito litros de capacidade e com seis litros da solução a ser testada. Utilizou-se seis animais por réplica, totalizando 120 animais, respeitando-se a densidade máxima de 1,0 girino por litro, de acordo com as recomendações da APHA (1998). As condições de temperatura e fotoperíodo de realização do experimento foram semelhantes às da aclimação (Figura 2).

Os testes tiveram duração de 96 horas em sistema estático, conduzidos em aquários de vidro revestidos internamente com sacos plásticos para evitar adsorção dos metais às paredes dos aquários e possível contaminação dos mesmos.

Os aquários foram dotados de aeração individual e cobertos por filme plástico transparente para evitar perdas de água por evaporação e conseqüente elevação da concentração do metal na água (LOMBARDI, 1999).

Durante o período de exposição os animais foram mantidos sem alimentação. A avaliação da mortalidade foi diária e os indivíduos mortos foram retirados dos recipientes sempre no mesmo horário. O critério de mortalidade adotado foi a ausência de reação a estímulos externos em animais depositados no fundo do aquário ou boiando.

Os parâmetros físicos e químicos da água (temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) foram determinados diariamente durante a realização dos testes.



**Figura 2** – Modelo empregado nos testes de toxicidade aguda com zinco, na Unidade Laboratorial Referencial de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA) do Instituto de Pesca, São Paulo – SP

### **3.5. Toxicidade crônica**

#### **3.5.1. Aclimação dos animais**

Para os experimentos de toxicidade crônica, a aclimação dos animais foi realizada da mesma maneira que para os testes de toxicidade aguda.

#### **3.5.2. Local de realização dos testes e metais utilizados**

Os testes de toxicidade crônica com sulfato de cobre e sulfato de cobre adicionado ao sulfato de zinco (1:1) foram conduzidos na sala de bioensaio do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV / UNESP, Campus de Jaboticabal – SP. Os testes de toxicidade crônica com sulfato de zinco foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Unidade Referencial de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA) do Instituto de Pesca, São Paulo – SP.

#### **3.5.3. Condução dos testes**

Foram coletados aleatoriamente 192 girinos no tanque de aclimação. Com a determinação da  $CL_{50}$  através dos testes de toxicidade aguda, realizou-se os testes de toxicidade crônica. Os girinos foram divididos em quatro grupos e transferidos para aquários sem a presença dos elementos (grupo controle = 0 mg/L) e nas concentrações correspondentes à  $CL_{50}/100$ ,  $CL_{50}/10$  e  $CL_{50}$  (Figura 3) conforme metodologia descrita por BASSOI et al. (1990).

Os testes foram efetuados em sistema semi-estático, com duração de 312 horas e renovação das soluções a cada 96 horas. A densidade inicial utilizada foi de 1 girino/L, com um total de 12 girinos por aquário com capacidade de 18L cada. Diariamente os parâmetros físicos e químicos da água foram aferidos (pH, oxigênio dissolvido,

condutividade elétrica e temperatura), da mesma maneira que nos testes de toxicidade aguda. Durante todo o experimento, o comportamento dos animais foi observado e, a cada 24 horas, os girinos que vieram a óbito foram retirados.

Amostras de sangue de dois girinos de cada aquário foram coletadas no início dos testes, antes da contaminação (momento zero), no 7º e no 14º dias, via punção do vaso caudal (FIGURA 4).



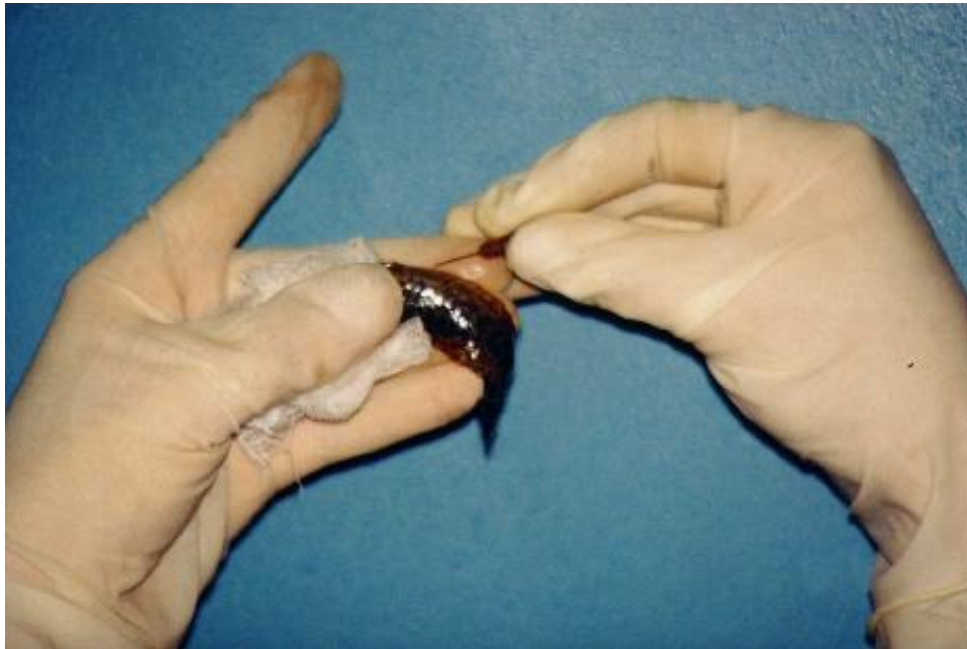
Figura 3 – Teste de toxicidade crônica com zinco realizado na Unidade Laboratorial Referencial de Patologia de Organismos Aquáticos (ULRPOA), do Instituto de Pesca, São Paulo – SP

### **3.6. Avaliação Hematológica**

#### **3.6.1. Coleta de Sangue**

O sangue dos animais expostos aos metais e do grupo controle foi coletado (10  $\mu$ L) por punção do vaso caudal (Figura 4) com auxílio de micropipeta com ponteiros heparinizadas (Anexo 1) e utilizado para as determinações de:

1. Hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito, segundo GOLDENFARB et al. (1971);
2. Taxa de hemoglobina (Hb), efetuada pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944) (Anexo 2);
3. Contagem de eritrócitos (Er) ou número total de células, realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente (Anexo 3);
4. Cálculo dos índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM), segundo WINTROBE (1934);
5. Contagem total e diferencial de leucócitos e total de trombócitos em extensões sanguíneas.



**Figura 4** – Coleta de sangue através de punção caudal em girinos de *Rana castesbeiana*, utilizados nos testes com sulfato de Cu e sulfato de Zn (Fonte: FERREIRA, 2002)

### 3.6.2. Contagem Diferencial de Leucócitos

Para a contagem diferencial de leucócitos (CDL) as extensões foram coradas pelo método de ROSENFELD (1947) (May-Grünwald e Giemsa – Anexo 4), mascaradas, codificadas e examinadas sob microscopia de luz comum, com objetiva de imersão (100X).

Foram contados 100 glóbulos brancos por lâmina. As células foram classificadas em cinco categorias: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, conforme sua morfologia e visualização ao microscópio, tomando-se por base os critérios adotados por DIAS (1992) e TURNER (1988).

### **3.6.3. Contagem Total de Leucócitos, Trombócitos e de Células Imaturas**

Todas as lâminas analisadas para a CDL, foram utilizadas para a contagem total de leucócitos, de trombócitos e de células imaturas. Foram contadas 2000 células por lâmina, classificando-as segundo metodologia proposta por HRUBE e SMITH (1998).

## **3.7. Tratamento Estatístico**

### **3.7.1. Testes de Toxicidade**

Para o cálculo da  $CL_{50}$  (96h) utilizou-se o método estatístico "Trimed Spearman-Kärber" (HAMILTON et al., 1977).

Nos testes de toxicidade crônica, a análise estatística foi efetuada utilizando o programa SAS, comparando-se os resultados obtidos para os animais do grupo-controle e para os animais expostos. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste de Tuckey (ZAR, 1996).

Na comparação entre as coletas realizadas no momento zero, aos 7 dias e aos 14 dias, em relação ao grupo controle, em concentrações sub-letais, utilizou-se o teste de variância ANOVA com dois fatores, uma vez que os parâmetros concentração do metal e tempo de exposição influenciaram os parâmetros hematológicos. Neste caso, a estatística paramétrica pôde ser utilizada devido à homogeneidade dos dados. Posteriormente, utilizou-se o teste de Tuckey para comparação de médias. Todos os testes foram realizados considerando nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Toxicidade aguda do sulfato de cobre para girinos de rã-touro

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água quantificados no início e no final do teste definitivo de toxicidade aguda com girinos de rã-touro foram, respectivamente, os seguintes:

- temperatura:  $26 \pm 2$  °C;
- pH:  $7,3 \pm 0,3$ ;
- condutividade elétrica:  $135 \pm 5$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ;
- oxigênio dissolvido =  $7,0 \pm 0,6$  mg/L;
- dureza =  $70 \pm 15$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$

Os resultados obtidos atendem aos padrões de exigência para condução de testes de toxicidade com anfíbios (SCHUYTEMA e NEBEKER, 1999) e às normas de cultivo desses organismos aquáticos (CULLEY, 1991).

A toxicidade do cobre, bem como de diversas substâncias químicas, está diretamente relacionada à dureza da água (DOUDOROFF e KATZ, 1953; RIEMER e TOTH, 1970; HELLAWELL, 1988 e DAMATO et al., 1989). Altos teores de carbonato de cálcio, que determinam a dureza da água, podem afetar a concentração de cobre. Numa água dura, o cobre se liga ao carbonato de cálcio formando compostos, principalmente quando há presença de matéria orgânica (RIEMER e TOTH, 1970; HELLAWELL, 1988). Além da dureza, a temperatura, o oxigênio dissolvido e o pH podem afetar a toxicidade do cobre.

#### 4.1.1. Determinação da CL<sub>50</sub>

Existem quatro métodos para o cálculo da CL<sub>50</sub>: Binomial, Moving Average, Probit e Trimmed Spearman Karber. Segundo LOMBARDI (1999), não há diferença significativa entre a CL<sub>50</sub> quando se usa um destes metodos. Portanto, optou-se pela utilização do método de Trimmed Spearman Karber, por ser o mais atual, mais utilizado e o mais preciso dos quatro.

Para os girinos de rã-touro, a CL<sub>50</sub> (96 h) do sulfato de cobre calculada pelo método Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1977) foi de 2,2 mg /L Cu (Tabela 2 e Figura 5).

**Tabela 2** – Porcentagens médias de mortalidade cumulativas obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de cobre com girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*

Tratamento (mg/L Cu)	Mortalidade (%) 96h
0,00	0,00
0,50	16,67
1,00	16,67
2,00	33,33
3,50	100,00

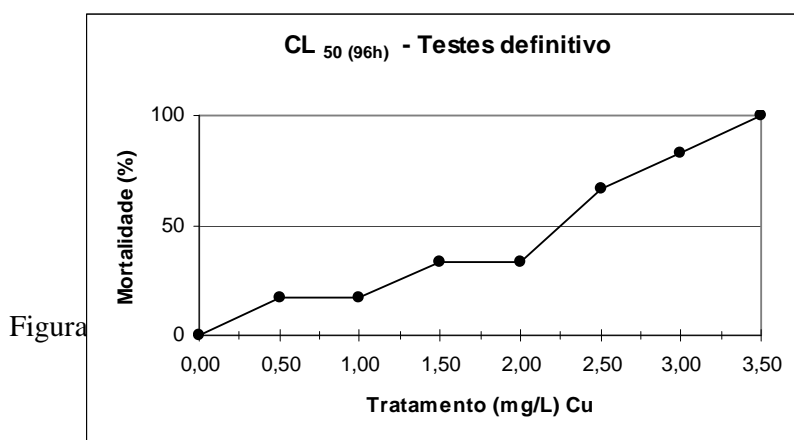


Figura 5 – mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Em 96 horas expostos ao sulfato de cobre

Os animais introduzidos nos aquários contendo sulfato de cobre mostraram discreto aumento na velocidade de natação comparado aos do grupo controle, com posterior retorno ao comportamento inicial. Entre 24-48 horas de exposição ocorreu a maioria dos óbitos (animais apresentando muco espesso) e se estendeu até o final do experimento, resultando em uma mortalidade de 100% dos animais nas concentrações mais elevadas.

Apesar de ser considerado um elemento-traço fundamental para algumas atividades celulares da comunidade aquática (MAZON, 2000), o cobre pode tornar-se tóxico. Dependendo da sensibilidade do organismo, este pode causar mortalidade ou estresse sub-letal, reduzindo a capacidade dos organismos aquáticos em competirem efetivamente nos seus habitats (MAZON, 2000).

Em excesso, o cobre é um clássico fator limitante para os organismos aquáticos (BENNETT et. al., 1995) e seus efeitos podem ser severos, chegando até a degeneração de certos tecidos (HUBSCHMAN, 1996). Além disso, íons de cobre podem participar da oxidação de lipídeos, estimulando a degradação da membrana lipídica (REDDY e BHAGYALAKSHMI, 1994). No entanto, em pequenas doses, o cobre é um micronutriente vital, necessário para a síntese de hemoglobina e importante componente da citocromo oxidase (BENNETT et al., 1995).

Os relatos sobre os valores de toxicidade aguda do cobre são bastante diferentes para os diversos grupos de animais aquáticos (FERREIRA, 2002), dependendo da sensibilidade, estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, atividade, ciclo reprodutivo, status nutricional do organismo exposto (PELGROM, 1994), forma química do metal na água, condições físicas e químicas do meio aquático e fisiologia do animal (MURTY, 1988).

LOMBARDI et al. (1999) afirmam existir inclusive, divergências nas determinações efetuadas para uma mesma espécie, que podem estar relacionadas com as

fases de desenvolvimento dos organismos aquáticos e/ou com o tamanho corporal e as condições físicas e químicas da água. Estes fatores podem explicar parcialmente os valores de  $CL_{50 - 96h}$  para girinos de *Rana catesbeiana* obtidos neste experimento (2,2 mg/L Cu), quando comparados com os dados obtidos por LOMBARDI et al. (1999), de 2,83 mg/L Cu e por FERREIRA (2002), de 2,4 mg/L Cu.

Em comparação com outras espécies de organismos aquáticos pode-se afirmar que os girinos de *Rana catesbeiana* são tolerantes ao cobre. Para peixes, JOHNSON e FINLEY (1980) encontraram valores de  $CL_{50 (96h)}$  para o cobre de 0,14 mg/L para *Salmo gairdneri*; 0,84 mg/L para *Pimaphales promelas*; 0,89 mg/L para *Lepomis macrochirus* e 1,38 mg/L para *Carassius auratus*. Segundo NAS (1977), o cobre tem efeito tóxico sobre invertebrados marinhos, mesmo em baixa concentração, como por exemplo a concentração de 0,1 mg/L, considerada altamente tóxica. Talvez a mais alta sensibilidade a esse produto seja a apresentada por alguns organismos do fitoplâncton, cuja fotossíntese pode ser inibida por concentrações de 0,006 mg/L, segundo LEWIS (1993), CLAYTON e CLAYTON (1994) e SENDACZ e KUBO (1999).

Na aquicultura, o sulfato de cobre é amplamente empregado para o controle de *blooms* algais e de infestações por macrófitas aquáticas, nas concentrações entre 0,5 e 2,0 mg/L Cu (BOYD e MASSAUT, 1999), calculadas a partir da alcalinidade média (em mg/L de  $CaCO_3$ ) da água (TUCKER e BOYD, 1978; SCHLENK et al. 1998). O fitoplâncton em excesso pode resultar em baixas concentrações de oxigênio dissolvido durante o período noturno, alteração no *off-flavor*, em peixes e crustáceos (causados por toxinas liberadas por algas cianofíceas), na liberação de alguns compostos tóxicos (cianotoxinas) para os organismos aquáticos e na modificação da estrutura, biomassa, sucessão e diversidade da comunidade zooplânctônica (ELER, 2000). As plantas aquáticas, além de diminuírem a transparência da coluna d'água quando em grande

quantidade, dificultam o manejo dos sistemas de cultivo, interferindo na alimentação e na colheita dos organismos cultivados (BOYD e TUCKER, 1998).

Além disso, muitos criadores de organismos aquáticos têm utilizado o sulfato de cobre para o tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias, platelmintos e nematódeos ectoparasitas ou como tratamentos profiláticos (CARDEILHAC e WHITAKER, 1988).

A absorção de cobre em peixes é passiva, envolvendo um gradiente de difusão do meio externo (aquático) para o meio interno (tecido e sangue) e há quatro principais rotas de entrada do cobre em organismos aquáticos: brânquias, pele, via ingestão de alimento e de água (HEATH, 1991). O transporte do cobre é assegurado por uma proteína, a ceruloplasmina, que também permite a utilização do ferro.

As brânquias são consideradas os principais sítios de absorção de cobre dissolvido no meio aquático para peixes, particularmente em animais de água doce. Estes órgãos, como o principal órgão de respiração, possuem extensa superfície em contato com o meio aquático (5 a 10 vezes a da superfície corpórea) e reduzida distância de difusão entre a água e o sangue (3-7  $\mu\text{m}$ ). Além disso, os animais aquáticos filtram um volume de água aproximadamente 20 vezes maior, comparativamente, ao volume de ar que os animais de respiração aérea tem de respirar para obter quantidade equivalente de oxigênio (HEATH, 1995 e STAGG e SHUTTLEWORTH, 1982).

Nos organismos aquáticos, o cobre induz hiperplasia do epitélio branquial prejudicando as trocas gasosas e iônicas (BOYD, 1990). Ocorre então, efeito combinado do estresse na osmorregulação com a precipitação de muco nas brânquias, que podem resultar na interrupção do mecanismo de trocas gasosas e do controle osmótico, causado, principalmente, por necrose nas brânquias, levando o indivíduo à morte por sufocamento (CUSIMANO et al., 1986). Em truta arco-íris, o cobre atinge diretamente

as brânquias, afetando a osmorregulação e causando modificações irreversíveis no epitélio branquial (SOLA et al., 1995). A extensa superfície branquial de algumas espécies aquáticas favorece a difusão de cobre do meio para o tecido branquial e posteriormente para o sangue (MAZON, 1997).

No caso dos girinos, as brânquias são internas e não apresentam uma abertura (opérculo). A água entra pela boca, realiza trocas gasosas nas brânquias e sai pela boca. Um outra via de absorção do cobre ocorre através da superfície corpórea, que representa 30% da respiração (STORER e USINGER, 1979). Pode ocorrer formação de excesso de muco sobre a superfície corpórea em girinos submetidos a estresse ou poluição (PECHMANN et al., 1991), como a do Cu e do Zn, por exemplo, que prejudica as trocas gasosas e iônicas, podendo levar os animais a morte (TORRE e LOPEZ-REVOL, 1991).

#### **4.2. Toxicidade crônica de sulfato de cobre para girinos de rã-touro**

A partir do valor de  $CL_{50}$  obtido no teste de toxicidade aguda, realizou-se o teste de toxicidade crônica do cobre com girinos de *Rana catesbeiana*. As concentrações utilizadas foram: CT = 0 mg/L (controle); T1 = 0,022 mg/L ( $CL_{50} / 100$ ); T2 = 0,22 mg/L ( $CL_{50} / 10$ ) e T3 = 2,2 mg/L ( $CL_{50}$ ).

Foram feitas observações de prováveis alterações nos parâmetros hematológicos do sangue de girinos de *Rana catesbeiana*, uma vez que produtos químicos podem provocar efeitos deletérios sobre as células vermelhas do sangue periférico de organismos aquáticos (DAS e NANDA, 1986; KRAUTER, 1993).

Os resultados das análises da série vermelha do sangue de rã-touro estão apresentados na Tabela 3 e Figuras 6 e 7.

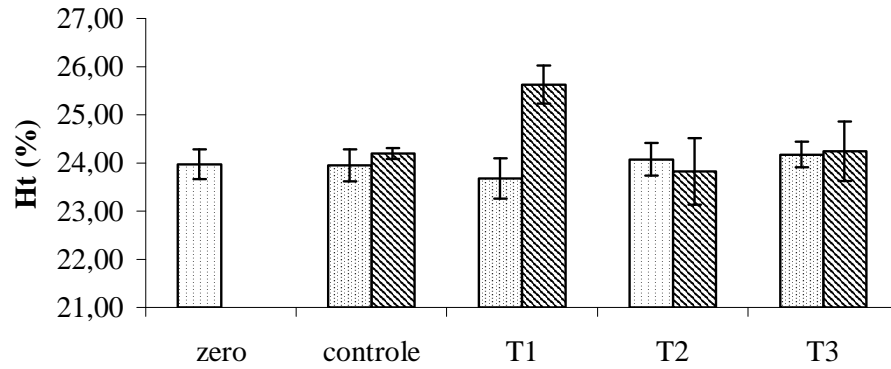
Tabela 3 – Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre

<b>Tratamentos</b>	<b>Ht</b> <b>x ± EPM</b>	<b>Hb</b> <b>x ± EPM</b>	<b>Er</b> <b>x ± EPM</b>	<b>VC</b> <b>x ± EPM</b>	<b>HC</b> <b>x ± EPM</b>	<b>CHC</b> <b>x ± EPM</b>
<b>zero</b>	23,98 <sup>a</sup> ± 0,31	8,24 <sup>a</sup> ± 0,53	36,25 <sup>a</sup> ± 0,79	664,57 <sup>a</sup> ± 11,92	22,87 <sup>a</sup> ± 1,41	34,37 <sup>a</sup> ± 2,03
<b>CT 7 dias</b>	23,95 <sup>a</sup> ± 0,33	8,46 <sup>a</sup> ± 0,77	28,00 <sup>a</sup> ± 1,58	864,90 <sup>a</sup> ± 56,97	30,21 <sup>a</sup> ± 2,32	35,31 <sup>a</sup> ± 3,06
<b>T1 7 dias</b>	23,68 <sup>a</sup> ± 0,42	7,19 <sup>a</sup> ± 1,01	28,25 <sup>a</sup> ± 0,48	839,21 <sup>a</sup> ± 25,73	25,44 <sup>a</sup> ± 3,47	30,36 <sup>a</sup> ± 4,23
<b>T2 7 dias</b>	24,08 <sup>a</sup> ± 0,34	8,35 <sup>a</sup> ± 0,34	25,75 <sup>a</sup> ± 0,85	937,75 <sup>a</sup> ± 31,42	32,46 <sup>a</sup> ± 1,17	34,68 <sup>a</sup> ± 1,31
<b>T3 7 dias</b>	24,18 <sup>a</sup> ± 0,27	10,29 <sup>a</sup> ± 0,13	25,50 <sup>a</sup> ± 0,65	950,47 <sup>a</sup> ± 32,76	40,46 <sup>a</sup> ± 1,43	42,58 <sup>a</sup> ± 0,59
<b>CT 14 dias</b>	24,20 <sup>a</sup> ± 0,11	8,16 <sup>a</sup> ± 0,62	25,50 <sup>a</sup> ± 1,55	958,62 <sup>a</sup> ± 52,61	32,11 <sup>a</sup> ± 2,32	33,73 <sup>a</sup> ± 2,57
<b>T1 14 dias</b>	25,63 <sup>a</sup> ± 0,40	7,14 <sup>a</sup> ± 1,08	26,50 <sup>a</sup> ± 0,65	968,80 <sup>a</sup> ± 28,48	27,24 <sup>a</sup> ± 4,70	27,87 <sup>a</sup> ± 4,31
<b>T2 14 dias</b>	23,83 <sup>a</sup> ± 0,69	8,09 <sup>a</sup> ± 0,61	26,25 <sup>a</sup> ± 1,31	917,46 <sup>a</sup> ± 66,38	30,85 <sup>a</sup> ± 2,09	34,10 <sup>a</sup> ± 2,97
<b>T3 14 dias</b>	24,25 <sup>a</sup> ± 0,62	12,22 <sup>a</sup> ± 0,39	25,50 <sup>a</sup> ± 0,87	956,25 <sup>a</sup> ± 53,84	48,12 <sup>a</sup> ± 2,33	50,43 <sup>a</sup> ± 1,28

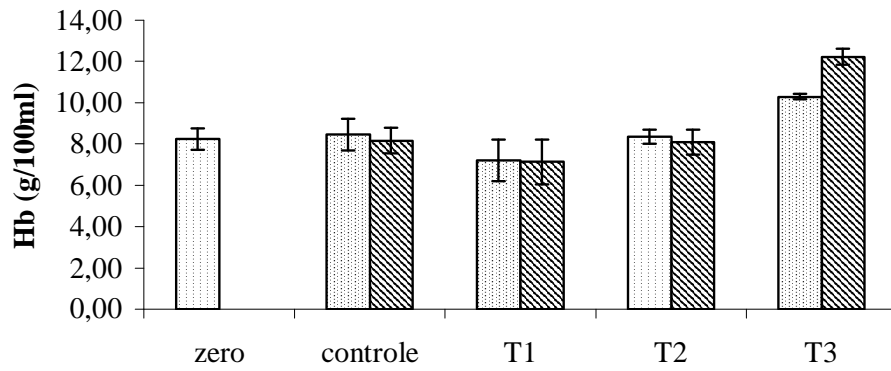
Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ( $10^4/\text{mm}^3$ ); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); CT = controle (0 mg/L); T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

### Hematócrito



### Hemoglobina



### Eritrócitos

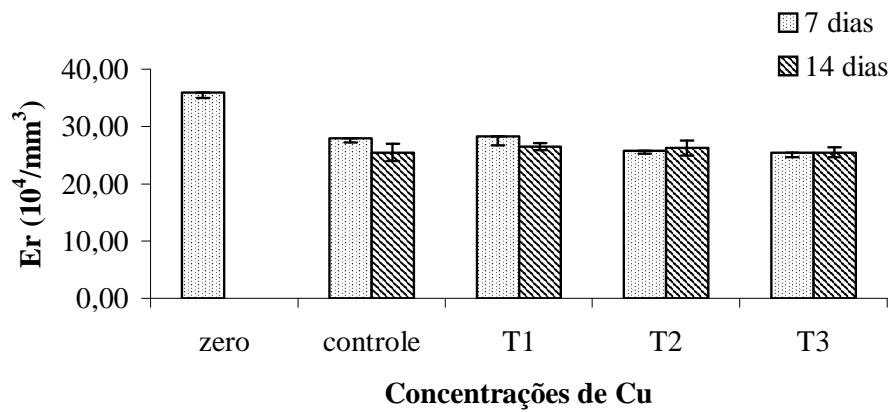


Figura 6 – Valores médios de hematócrito, taxa de hemoglobina e número de eritrócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre

CT = 0 mg/L; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

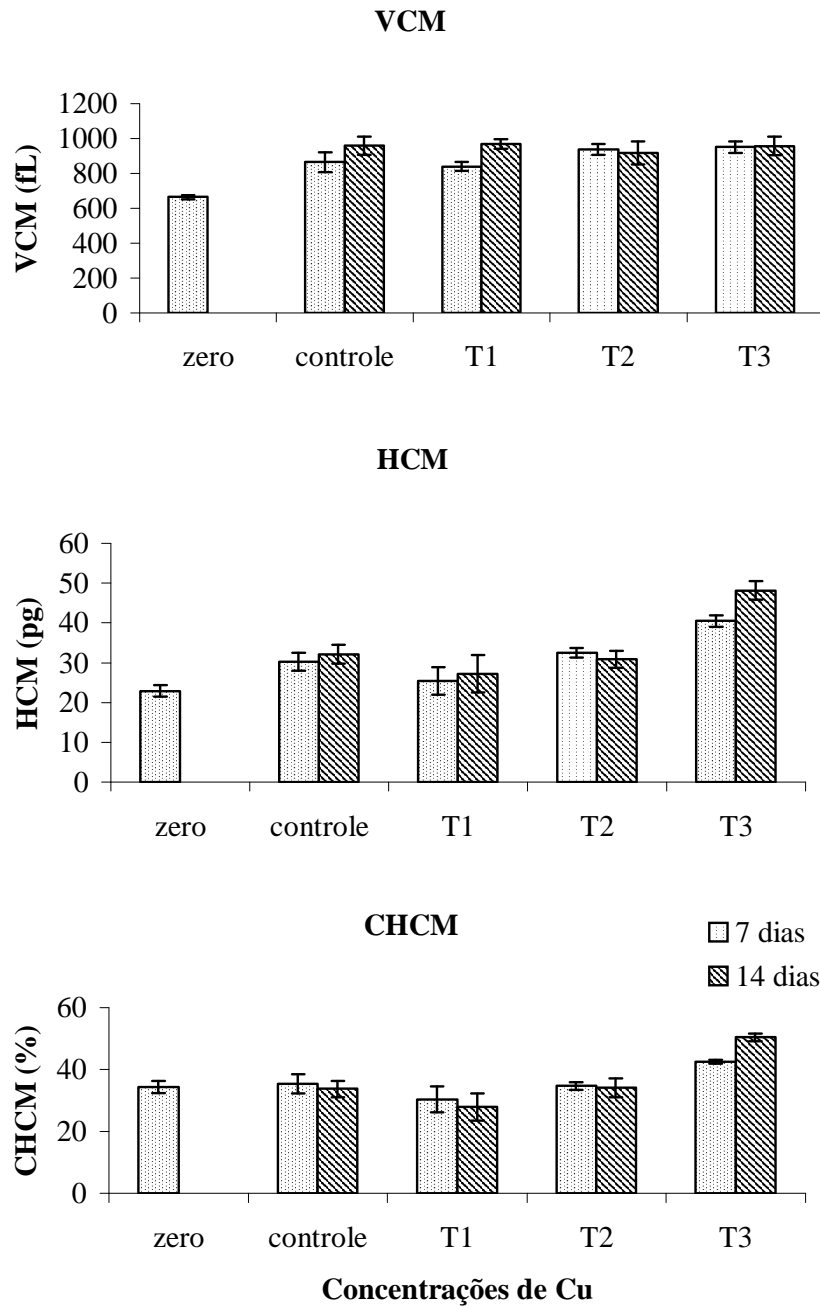


Figura 7 – Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre

(CT = 0 mg/L; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>)

Pode-se notar pelas figuras 6 e 7 que os valores médios de hematócrito de girinos de rãs-touro expostos ao sulfato de cobre apresentaram maior valor para o tratamento T1 (CL<sub>50</sub>/100), aos 14 dias. Esse aumento, porém não foi significativo ( $p < 0,05$ ). Para a taxa de hemoglobina, os maiores valores ocorreram no tratamento T3 (CL<sub>50</sub>), também não significativamente diferentes dos demais. Para o número de eritrócitos os maiores valores foram os do momento zero, também não diferente significativamente dos demais valores. Para os índices hematimétricos, os valores mantiveram-se praticamente os mesmos e não foi verificada diferença significativa entre as médias dos diferentes tratamentos.

As alterações sanguíneas mais frequentes e importantes conseqüentes da intoxicação por cobre são as metahemoglobinemias, anemias hemolíticas e citopenias (SCHVARTSMAN, 1991). Baixos valores do número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina indicam anemia e, em inúmeros casos, devem-se às inibições da eritropoiese por hemorragias em órgãos internos causadas por produtos tóxicos (RAO et al., 1990). Alterações significativas na quantidade de hemoglobina em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) expostas a concentrações sub-letais de cobre foram observadas por CYRIAC et al. (1989), indicando hemodiluição. Os metais provocam alterações na afinidade do sangue por oxigênio, provocando inchaço nas células vermelhas como resposta à intoxicação por metais pesados. Essas alterações foram verificadas no presente trabalho, porém os valores não foram significativos.

CYRIAC (1989), demonstrou que o cobre penetra no eritrócito, inibe a glicólise e denatura a hemoglobina. O aumento da hemoglobina em animais expostos ao cobre pode ser explicado como um processo onde o corpo produz aumento da quantidade de hemoglobina para repor a oxidada ou denaturada.

Entretanto, o cobre é necessário para a atividade de enzimas associadas com o metabolismo do ferro. Atua juntamente com a ceruloplasmina, uma proteína que diminui a habilidade do íon ferroso de atuar como catalizador no transporte de oxigênio, na ação de enzimas associadas à formação de colágeno e elastina, na produção de melanina e na integridade do sistema nervoso central (HERKOVITS e HELGUERO, 1998).

Além disso, a contaminação por cobre em organismos aquáticos pode levar a complicações respiratórias (ERIKSSON e WEEKS, 1994), alterar o transporte na membrana celular e as funções mitocondriais (REDDY e BHAGYALAKSHMI, 1994), podendo levar os animais à morte.

Na Tabela 4 e Figuras 8 e 9 estão representados os valores do número de células vermelhas imaturas e de trombócitos. Nota-se que as células imaturas apresentaram valores mais elevados em T3 (CL<sub>50</sub>) aos 7 dias. BUCKLEY (1976) observou que há aumento no número de células vermelhas imaturas circulantes quando *Onchorhynchus kisutch* foi exposto a diferentes poluentes. Isto pode ter sido devido à estimulação do tecido hematopoiético para aumentar o transporte de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> como resultado do aumento da atividade metabólica ou da alteração das membranas branquiais causando falha na troca gasosa. Esse aumento das células vermelhas imaturas coincidiu com o aumento da taxa de hemoglobina, no mesmo tratamento, como esperado pois essas células contêm menos quantidade deste pigmento (Figura 5).

Quanto aos trombócitos verificou-se que houve aumento no número dessas células no tratamento T3 (CL<sub>50</sub>), aos 7 dias de exposição. A função destas células em sangue de anfíbios é ainda pouco conhecida, uma vez que nesses animais ela é uma célula que talvez participe do processo de defesa dos organismos, como ocorre em peixes, segundo MATUSHIMA e MARIANO (1996). O aumento de plaquetas em

mamíferos pode ser verificado em certos processos fisiológicos com hemorragias (JANINI e JANINI, 1990), mas no caso dos girinos de rã-touro expostos ao sulfato de cobre, este fato é difícil de ser explicado pela falta de informações a respeito dessas células.

Tabela 4 - Valores médios ( $\bar{x}$ ) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células vermelhas imaturas (Imat.) e de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre

Tratamentos	Imat.	Trombócitos
	$\bar{x} \pm \text{EPM}$	$\bar{x} \pm \text{EPM}$
zero	191,00 <sup>b</sup> $\pm$ 7,23	9535,75 <sup>b</sup> $\pm$ 525,60
CT 7 dias	146,25 <sup>c</sup> $\pm$ 6,88	7356,25 <sup>b</sup> $\pm$ 517,04
T1 7 dias	132,50 <sup>c</sup> $\pm$ 5,20	6696,25 <sup>b</sup> $\pm$ 323,57
T2 7 dias	183,50 <sup>b</sup> $\pm$ 3,80	9256,50 <sup>b</sup> $\pm$ 404,16
T3 7 dias	260,00 <sup>a</sup> $\pm$ 33,48	11567,50 <sup>a</sup> $\pm$ 1695,16
CT 14 dias	128,75 <sup>c</sup> $\pm$ 9,44	6360,00 <sup>c</sup> $\pm$ 216,59
T1 14 dias	158,50 <sup>c</sup> $\pm$ 14,61	6625,75 <sup>c</sup> $\pm$ 296,19
T2 14 dias	208,50 <sup>b</sup> $\pm$ 3,80	7967,75 <sup>b</sup> $\pm$ 357,21
T3 14 dias	171,00 <sup>c</sup> $\pm$ 9,91	3498,75 <sup>c</sup> $\pm$ 1062,88

CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

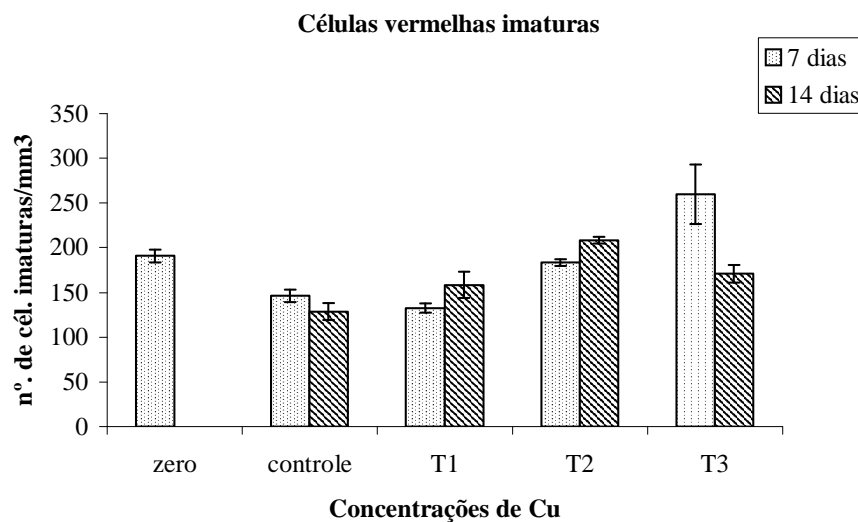


Figura 8 – Valores médios do número de células vermelhas imaturas de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre  
 CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

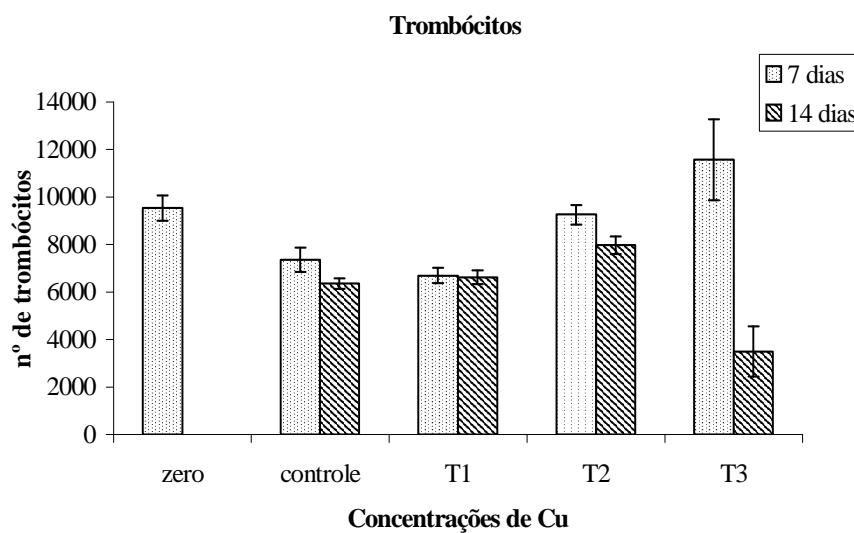


Figura 9 - Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre  
 CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

Na tabela 5 e figura 10 estão apresentados os valores médios da contagem diferencial dos leucócitos de girinos de rã-touro expostos ao sulfato de cobre.

No sangue periférico de rã-touro foram encontrados os leucócitos: linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os linfócitos foram a célula branca mais freqüente. FERREIRA et al. (2003), analisando a porcentagem das células brancas no sangue de girinos de *Rana catesbeiana* expostos ao oxiclreto de cobre, também observou que os linfócitos foram as células mais freqüentemente encontrados (94,22%), seguidos pelos basófilos (2,82%), neutrófilos (2,08%), eosinófilos (0,74%) e monócitos (0,14%). Os mesmos autores observaram, após 312 horas, diminuição do número de linfócitos e de neutrófilos, resposta típica de inflamação aguda, sem, no entanto ocorrer alteração na porcentagem de monócitos.

Nota-se, pela figura 10 que leucócitos não variaram muito de valor, sendo que o único valor significativo foi a média dos neutrófilos no tratamento T3 (CL<sub>50</sub>), tanto em 7, como em 14 dias, que apresentou aumento de número, indicando neutrofilia. Nos tratamentos T1 (CL<sub>50</sub>/100) e T2 (CL<sub>50</sub>/10) observou-se leucopenia por neutropenia. Os valores de linfócitos foram maiores em T2, embora bastante próximos aos demais tratamentos. Observou-se eosinofilia no T1 aos 14 dias e no T2 aos 7 dias, indicando, provavelmente, uma reação alérgica destes animais ao sulfato de cobre, conforme descrito por JANNINI e JANNINI (1978). Em parte, essas alterações podem ser explicadas por modificações no tecido hematopoiético alterando o processo de formação dessas células.

Alterações na quantidade de glóbulos brancos em animais expostos ao sulfato de cobre também foram encontradas por SCHVARTSMAN (1991).

O cobre é considerado imunossupressor e parece agir através da resposta geral ao estresse possivelmente através da produção de cortisol (SCHLENK et al., 1999). PULSFORD et al. (1995) demonstraram que o cortisol é imunossupressivo em *Limanda limanda* limitando a função dos macrófagos e dos linfócitos.

Tabela 5 - Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de cobre

Tratamentos	Lc x ± EPM	Lf x ± EPM	Mn x ± EPM	Nt x ± EPM	Bs x ± EPM	Es x ± EPM
Zero	13671,00 <sup>a</sup> ± 515,40	10145,19 <sup>a</sup> ± 421,00	160,00 <sup>b</sup> ± 14,00	817,00 <sup>b</sup> ± 37,00	1816,00 <sup>a</sup> ± 84,00	598,00 <sup>a</sup> ± 95,00
CT 7 dias	10821,00 <sup>a</sup> ± 2406,01	8246,00 <sup>b</sup> ± 457,00	166,00 <sup>b</sup> ± 30,00	708,00 <sup>b</sup> ± 116,00	1760,00 <sup>a</sup> ± 194,00	251,00 <sup>c</sup> ± 53,00
T1 7 dias	9408,00 <sup>a</sup> ± 1547,19	7658,25 <sup>b</sup> ± 307,00	158,00 <sup>b</sup> ± 37,00	560,00 <sup>c</sup> ± 80,00	1572,00 <sup>b</sup> ± 297,00	284,00 <sup>c</sup> ± 78,00
T2 7 dias	14150,00 <sup>a</sup> ± 2200,54	10567,00 <sup>a</sup> ± 229,00	213,00 <sup>a</sup> ± 43,00	781,00 <sup>b</sup> ± 96,00	1954,00 <sup>a</sup> ± 214,00	636,00 <sup>a</sup> ± 141,00
T3 7 dias	10213,00 <sup>a</sup> ± 2388,15	7857,75 <sup>b</sup> ± 435,00	176,00 <sup>b</sup> ± 29,00	1538,00 <sup>a</sup> ± 223,00	1900,00 <sup>a</sup> ± 254,00	445,00 <sup>b</sup> ± 24,00
CT 14 dias	8699,00 <sup>b</sup> ± 1869,74	6945,75 <sup>b</sup> ± 590,00	146,00 <sup>b</sup> ± 38,00	581,00 <sup>c</sup> ± 56,00	1263,00 <sup>b</sup> ± 212,00	352,00 <sup>b</sup> ± 60,00
T1 14 dias	12064,00 <sup>a</sup> ± 1860,30	9076,00 <sup>b</sup> ± 721,00	157,00 <sup>b</sup> ± 45,00	692,00 <sup>b</sup> ± 68,00	1574,00 <sup>b</sup> ± 217,00	565,00 <sup>a</sup> ± 29,00
T2 14 dias	14361,00 <sup>a</sup> ± 2261,59	10765,25 <sup>a</sup> ± 275,00	252,00 <sup>a</sup> ± 37,00	823,00 <sup>b</sup> ± 24,00	2055,00 <sup>a</sup> ± 326,00	466,00 <sup>b</sup> ± 122,00
T3 14 dias	10649,00 <sup>a</sup> ± 2061,34	6886,00 <sup>b</sup> ± 497,07	105,00 <sup>c</sup> ± 6,24	1784,00 <sup>a</sup> ± 276,00	1365,00 <sup>b</sup> ± 120,60	354,00 <sup>b</sup> ± 83,83

Lc = leucócitos totais/mm<sup>3</sup>; Lf = linfócitos/mm<sup>3</sup>; Mn = monócitos/mm<sup>3</sup>; Nt = neutrófilos/mm;

Bs = basófilos/mm<sup>3</sup>; Es = eosinófilos/mm<sup>3</sup>

CT = tratamento controle; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

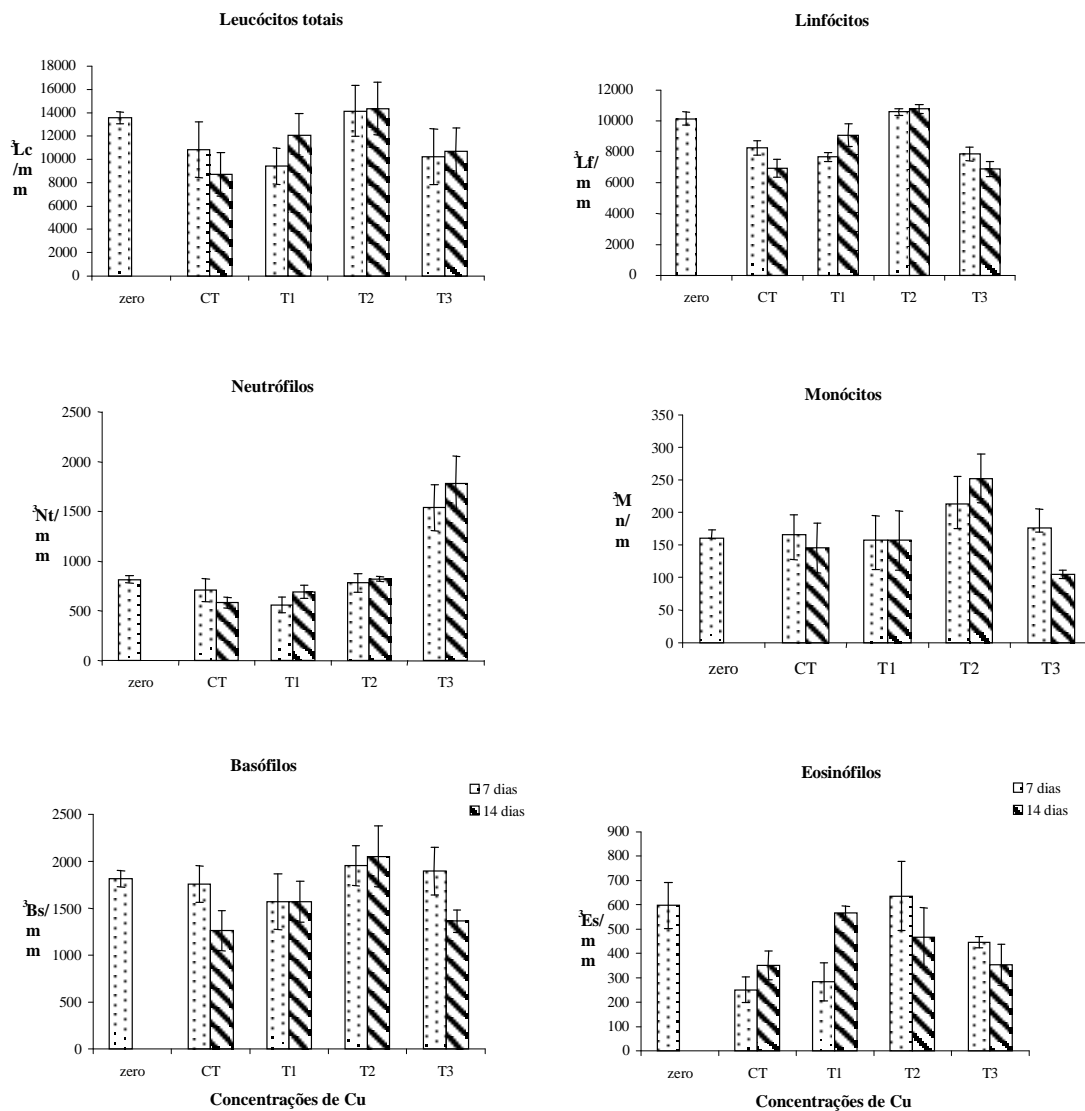


Figura 10 - Valores médios do número de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre

CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

### 4.3. Toxicidade aguda de sulfato de zinco para girinos de rã-touro

#### 4.3.1. Testes definitivos

Com relação aos valores dos parâmetros físicos e químicos da água quantificados no início e no final do teste definitivo de toxicidade aguda com girinos de rã-touro, os valores médios foram, respectivamente, os seguintes:

- temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C;
- pH:  $7,5 \pm 0,3$ ;
- condutividade elétrica:  $130 \pm 5$   $\mu$ S/cm;
- oxigênio dissolvido =  $7,5 \pm 0,2$  mg/L;
- dureza =  $60 \pm 18$  mg Ca CO<sub>3</sub>/L.

Os resultados dos testes definitivos de toxicidade aguda de zinco para girinos de rã-touro estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 11.

Tabela 6 – Porcentagens médias de mortalidade cumulativa obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de Zn com girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*

<b>Tratamento (mg/L)</b>	<b>Mortalidade (%) 96h</b>
0,00	0,00
2,00	41,67
3,00	50,00
4,00	75,00

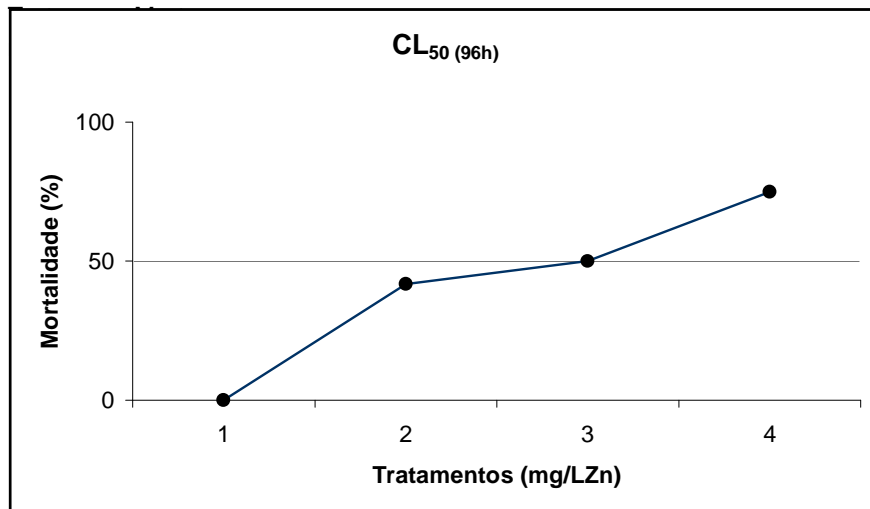


Figura 11 – Mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em 96 horas expostos ao sulfato de zinco

#### 4.3.2. Determinação da CL<sub>50</sub>

Os parâmetros físicos e químicos da água atendem aos padrões de exigência para condução de testes de toxicidade com anfíbios (SCHUYTEMA e NEBEKER, 1999) e às normas de cultivo desses organismos aquáticos (CULLEY, 1991).

Para os girinos de rã-touro, os valores a CL<sub>50(96 horas)</sub> calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi de 2,78 mg/L de zinco.

Os animais expostos às diferentes concentrações de zinco não apresentaram alterações comportamentais.

Milhares de animais aquáticos são mortos, periodicamente, em nossos rios, por causa da aplicação de substâncias que contêm zinco, no combate a fungos que

constituem pragas da lavoura. Essas substâncias são, depois, arrastadas pelas chuvas, para os rios, onde em concentrações da ordem de 0,5 mg/L já podem provocar grandes mortandades. Um organismo aquático que não é muito sensível à ação tóxica da substância absorve-a do meio, acumulando-a em suas células ou tecidos. Outros organismos aquáticos, alimentando-se dos primeiros, acumulam ainda maiores quantidades de tóxicos e assim por diante. Há, dessa forma, uma potencialização progressiva ou efeito cumulativo do tóxico ao longo da cadeia trófica, de tal forma que os últimos elementos dessa cadeia, ao se alimentarem dos seus inferiores, recebem uma carga altamente concentrada da substância nociva, podendo perecer ou apresentar sintomas de doenças graves (BRANCO e ROCHA, 1987).

O zinco é um dos principais tóxicos presentes em água de rios (COLE, 1972; BRANCO, 1974a), sendo o mais freqüente e mais persistente na cadeia trófica, uma vez que a biodegradação não é eficiente após bioconcentração (SOLBE, 1973).

As referências bibliográficas a respeito do efeito tóxico do zinco são totalmente contraditórias. RUSHTON (1922) afirma que 1000 ppm de sulfato de zinco não produzem nenhum efeito sobre trutas em um período de 24 horas e depois afirma que carpas jovens podem morrer em um dia de exposição a 1 ppm de cloreto de zinco (RUSHTON, 1949). AFFLECK (1952) cita o caso de intoxicação por este metal, atingindo 54% de 628 trutas jovens, com uma concentração de 0,01 ppm de zinco, JONES (1939) e OSHIMA (1931) afirmam que sulfato e cloreto de zinco, em concentrações de 0,3 a 0,7 ppm são decididamente tóxicos a organismos aquáticos, que podem morrer em apenas 12 horas de contato com a substância. ELLIS (1937) observou que peixes vermelhos não sofrem aparentemente nenhum efeito quando em presença de 100 ppm de sulfato de zinco, em águas duras, enquanto que 1000 ppm constitui uma dose rapidamente fatal. Já KLEEREKOPER (1946), estudando um caso de mortandade

de peixes causada pelo zinco, em um tanque de criação, acredita que a reação entre o  $\text{CO}_2$  da água e o zinco dos canos galvanizados, dá origem a bicarbonato de zinco que é tóxico em concentrações de 5 a 10 ppm. FINN (1940) refere-se a uma mortandade de peixes causada por 1 ppm de zinco enquanto que GOODMAN (1951) estudando os truta arco-íris afirma que aqueles podem resistir a concentrações de 8 a 11 ppm de zinco e acredita que a diversidade de dados se deva a um aumento adaptativo, à resistência dos peixes, etc. BRANCO (1960) acredita na possibilidade de algum outro fator existente na água, com ação sinérgica (aumentando a toxidez do elemento ou a sensibilidade do peixe a baixas concentrações) ou antagônica (baixando a toxidez do metal ou elevando o limiar de sensibilidade do peixe), uma vez que resultados discrepantes nem sempre podem ser explicados por diferenças dos compostos utilizados ou das espécies de organismos aquáticos consideradas, como pretende LEGER (1912).

Além da existência de diferença de intensidade de ação tóxica do zinco quando combinado a diferentes metais e da resistência específica dos organismos aquáticos, o fato das intoxicações por zinco se darem sempre simultaneamente com o emulsionamento de ar na água, leva à hipótese de maior desprendimento de zinco, nos canos. Isto pode ocorrer por efeito das variações bruscas de pressão ou por interferência direta da oxigenação da água neste processo. A ocorrência de ar emulsionado aumenta a probabilidade de coagulação da mucilagem nas brânquias e na superfície do corpo, tornando assim, mais eficiente a ação do metal na asfixia dos organismos (BRANCO, 1960). Isto vai de encontro à teoria de que o oxigênio geralmente aumenta a resistência dos organismos à ação de substâncias tóxicas, defendida por WESTFALL (1945) e por TARZEWLL (1958).

Um dos problemas na determinação da  $\text{CL}_{50}$  de metais, como o zinco, para uma população de organismos aquáticos é que a concentração letal varia dependendo da

dureza da água (HOWARTH e SPRAGUE, 1978; CHAKOUMAKOS et al., 1979; CALAMARI et al., 1980; BRADLEY e SPRAGUE, 1985, PAULAUSKIS e WINNER, 1988; KALLANAGOUDAR e PATIL, 1997; BARATA et al., 1998; ALSOP e WOOD, 1999), do pH (CUSIMANO et al., 1986), da matéria orgânica dissolvida (CLEVEN e VAN LEEUWEN, 1986; EPA, 1991; MACFIE et al., 1994; KIM et al., 1999; MA et al., 1999), das espécies utilizadas (CRUMP, 1992; FELLERS, 1993; EISLER, 1998), do estatus social (SLOMAN et al., 2003) e da idade dos animais (DAVIES et al., 1976; EISLER, 1998).

Embora um grande número de autores tenha demonstrado o efeito do pH na toxicidade do zinco, suas conclusões também são muitas vezes contraditórias. Alguns autores observaram aumento na toxicidade do zinco com aumento do pH (CUSIMANO et al., 1986; EVERALL et al., 1989; SCHUBAUER-BERIGAN et al., 1993; HEIJERICK et al., 2002). Uma relação inversa entre pH e toxicidade do zinco foi observada por BELANGER e CHERRY (1990).

#### **4.3.3. Toxicidade crônica de sulfato de zinco para girinos de rã-touro**

A partir do valor de  $CL_{50}$  obtido no teste de toxicidade aguda, realizou-se o teste de toxicidade crônica do zinco com girinos de *Rana catesbeiana*. Os valores utilizados nos quatro tratamentos foram: 0 mg /L (controle); 0,0278 mg/L ( $CL_{50} /100$ ); 0,278 mg/L ( $CL_{50}/10$ ) e 2,78 mg/L ( $CL_{50}$ ).

Nas tabela 7 e figuras 12 e 13 estão representados os valores médios do eritrograma de girinos de rã-touro expostos ao sulfato de zinco. Os valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos não diferiram estatisticamente entre as coletas ( $p < 0,05$ ). O mesmo ocorreu com os valores de VCM, HCM e CHCM. Entretanto, nota-se que as médias dos valores de taxa de hemoglobina e do número de eritrócitos foram

ligeiramente inferiores nos tratamentos T2 (CL<sub>50</sub>/10) e T3 (CL<sub>50</sub>), aos 14 dias e a dos valores de HCM no tratamento T1 (CL<sub>50</sub>/100) aos 7 dias, foi superior aos demais.

Concentrações subletais de zinco, bem como de outros produtos tóxicos no ambiente aquático podem não resultar em mortalidade imediata dos animais, mas tem efeitos sobre estes e resultam em inúmeras disfunções fisiológicas (OMOREGIE et al., 1994). A exposição de organismos a baixas concentrações de um determinado produto por um longo período de tempo pode resultar em um efeito semelhante quando há exposição a concentrações elevadas por um curto período de tempo (HELLAWELL, 1988).

O zinco tem papel principal na estabilidade de membranas biológicas por competição com metais redox ativos como o cobre e ferro (HERKOVITZ e HELGUERO, 1998), podendo interferir desta maneira na síntese de hemoglobina, o que parece não ter ocorrido no presente trabalho.

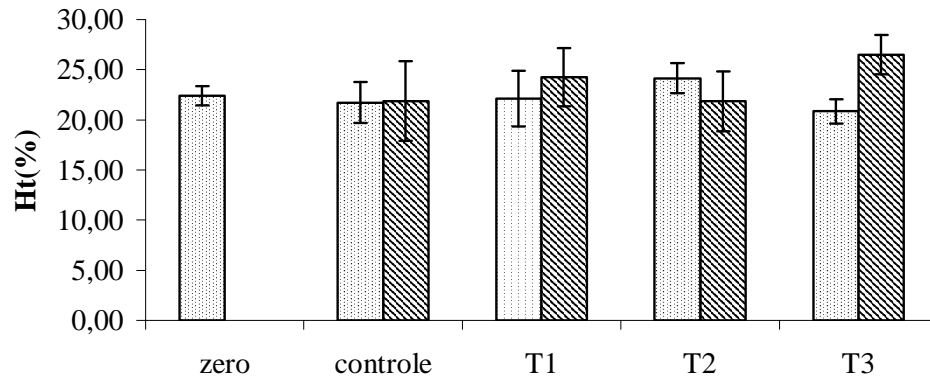
**Tabela 7** - Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de zinco

Trata- mentos	Ht x ± EPM	Hb x ± EPM	Er x ± EPM	VCM x ± EPM	HCM x ± EPM	CHCM x ± EPM
zero	22,42 <sup>a</sup> ± 0,94	7,59 <sup>a</sup> ± 0,57	39,0 <sup>a</sup> ± 3,12	630,39 <sup>a</sup> ± 67,79	22,14 <sup>a</sup> ± 3,96	34,54 <sup>a</sup> ± 3,03
CT 7 dias	21,71 <sup>a</sup> ± 2,06	7,04 <sup>a</sup> ± 0,17	26,0 <sup>a</sup> ± 3,39	891,44 <sup>a</sup> ± 163,47	28,45 <sup>a</sup> ± 3,50	33,18 <sup>a</sup> ± 2,70
T1 7 dias	22,11 <sup>a</sup> ± 2,80	7,67 <sup>a</sup> ± 0,57	25,5 <sup>a</sup> ± 7,29	1235,72 <sup>a</sup> ± 495,6	46,91 <sup>a</sup> ± 20,21	36,98 <sup>a</sup> ± 6,36
T2 7 dias	24,14 <sup>a</sup> ± 1,51	7,05 <sup>a</sup> ± 0,27	29,0 <sup>a</sup> ± 3,85	884,56 <sup>a</sup> ± 145,1	25,29 <sup>a</sup> ± 2,56	29,59 <sup>a</sup> ± 2,32
T3 7 dias	20,86 <sup>a</sup> ± 1,21	5,65 <sup>a</sup> ± 0,32	33,5 <sup>a</sup> ± 0,96	624,68 <sup>a</sup> ± 41,65	16,94 <sup>a</sup> ± 1,16	27,24 <sup>a</sup> ± 1,40
CT 14 dias	21,89 <sup>a</sup> ± 3,97	5,32 <sup>a</sup> ± 0,63	30,8 <sup>a</sup> ± 2,63	728,14 <sup>a</sup> ± 154,52	17,29 <sup>a</sup> ± 1,27	25,99 <sup>a</sup> ± 4,10
T1 14 dias	24,26 <sup>a</sup> ± 2,91	6,73 <sup>a</sup> ± 0,96	41,5 <sup>a</sup> ± 7,29	603,6 <sup>a</sup> ± 37,49	16,55 <sup>a</sup> ± 0,67	27,58 <sup>a</sup> ± 1,12
T2 14 dias	21,86 <sup>a</sup> ± 3,01	3,47 <sup>a</sup> ± 0,24	27,3 <sup>a</sup> ± 5,57	901,92 <sup>a</sup> ± 231,15	14,28 <sup>a</sup> ± 2,58	17,75 <sup>a</sup> ± 4,60
T3 14 dias	26,49 <sup>a</sup> ± 1,95	6,41 <sup>a</sup> ± 0,47	40,0 <sup>a</sup> ± 3,81	674,40 <sup>a</sup> ± 62,21	16,24 <sup>a</sup> ± 1,26	24,30 <sup>a</sup> ± 1,40

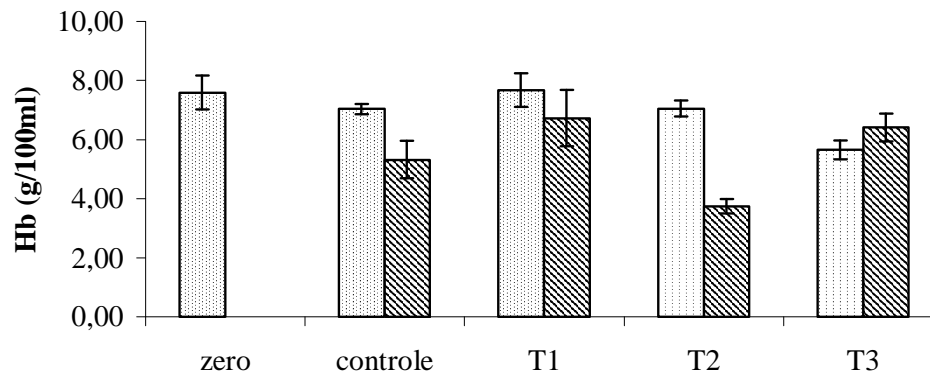
Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos (10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si p<0,05)

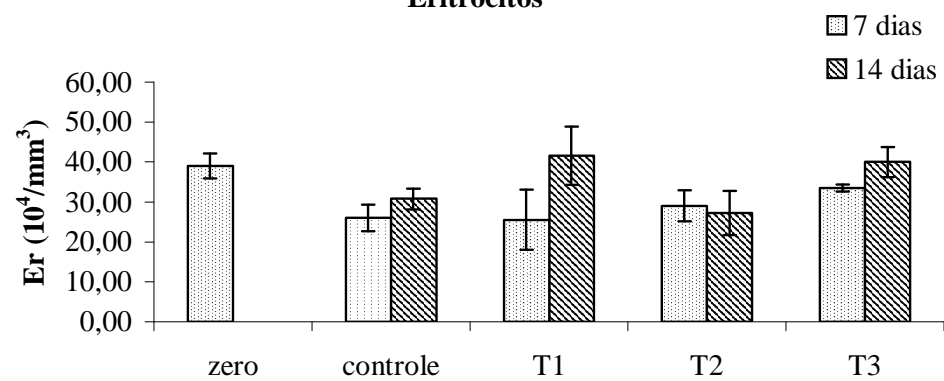
### Hematócrito



### Hemoglobina



### Eritrocitos



### Concentrações de Zn

Figura 12 - Valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de zinco

CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

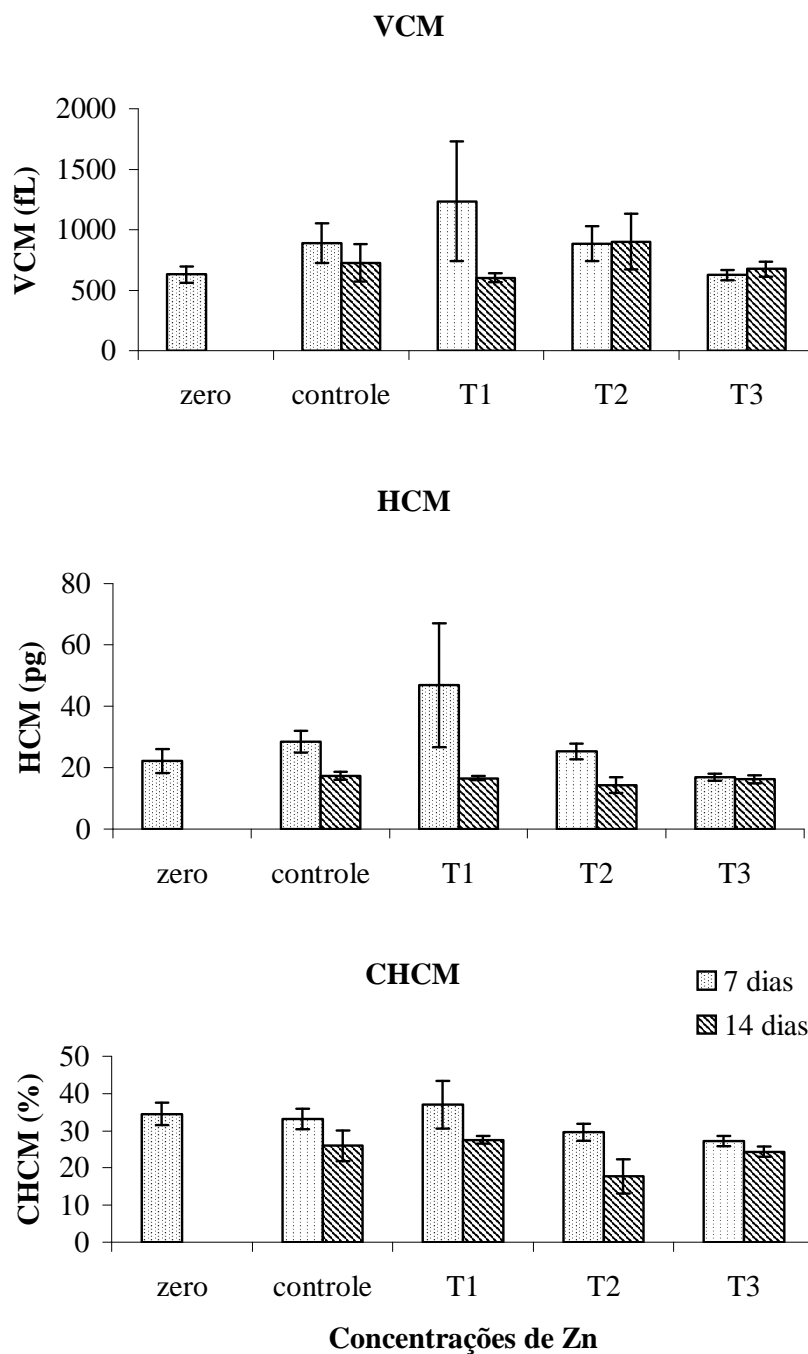


Figura 13 – Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de zinco

**CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>**

Na Tabela 8 e Figuras 14 e 15 estão representados os valores médios do número de células vermelhas imaturas e dos trombócitos. Os valores médios de células imaturas mostraram-se inferiores no tratamento T1 (CL<sub>50</sub>/100) aos 7 dias e superiores no mesmo tratamento aos 14 dias (Figura 14) sem que, no entanto, houvesse alteração nos valores do hemograma, como demonstrado na Figura 12. O mesmo comportamento foi observado com os valores médios de trombócitos.

Em embriões de anfíbios, o zinco pode proteger de malformações espontâneas, bem como dos distúrbios de desenvolvimento e mortalidade provocados por vários metais, tais como cádmio, chumbo, alumínio e mercúrio (HERKOVITS e HELGUERO, 1998).

A ação tóxica do zinco está baseada na interrupção da absorção de cálcio pelas brânquias, uma vez que ocorre competição entre estes dois metais, o que pode levar os animais à morte (HEIJERICK et al. 2002). Em girinos, este fato ainda não está bem elucidado, não se conhecendo como se dá a absorção de cálcio nestes animais.

As células vermelhas imaturas apresentaram aumento de número tanto no grupo controle quanto no demais expostos às diferentes concentrações de sulfato de zinco, em relação aos do momento zero.

**Tabela 8** - Valores médios (  $\bar{x}$  ) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células vermelhas imaturas (Imat.) e de trombócitos girinos de de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de zinco

<b>Tratamentos</b>	<b>Imat.</b> <b><math>\bar{x} \pm \text{EPM}</math></b>	<b>Trombócitos</b> <b><math>\bar{x} \pm \text{EPM}</math></b>
zero	215,75 <sup>b</sup> ± 25,35	10229,19 <sup>b</sup> ± 1356,49
CT 7 dias	229,00 <sup>b</sup> ± 67,98	8548,25 <sup>b</sup> ± 2237,33
T1 7 dias	154,00 <sup>c</sup> ± 42,85	6912,00 <sup>c</sup> ± 1608,43
T2 7 dias	237,50 <sup>b</sup> ± 16,39	9072,50 <sup>b</sup> ± 1539,41
T3 7 dias	249,50 <sup>b</sup> ± 47,25	6830,75 <sup>c</sup> ± 442,30
CT 14 dias	302,50 <sup>b</sup> ± 26,26	13727,50 <sup>b</sup> ± 1655,69
T1 14 dias	383,25 <sup>a</sup> ± 99,01	15779,50 <sup>a</sup> ± 3720,07
T2 14 dias	272,50 <sup>b</sup> ± 55,73	11120,00 <sup>b</sup> ± 2246,58
T3 14 dias	307,00 <sup>b</sup> ± 78,46	8026,25 <sup>b</sup> ± 2713,19

CT = tratamento controle; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

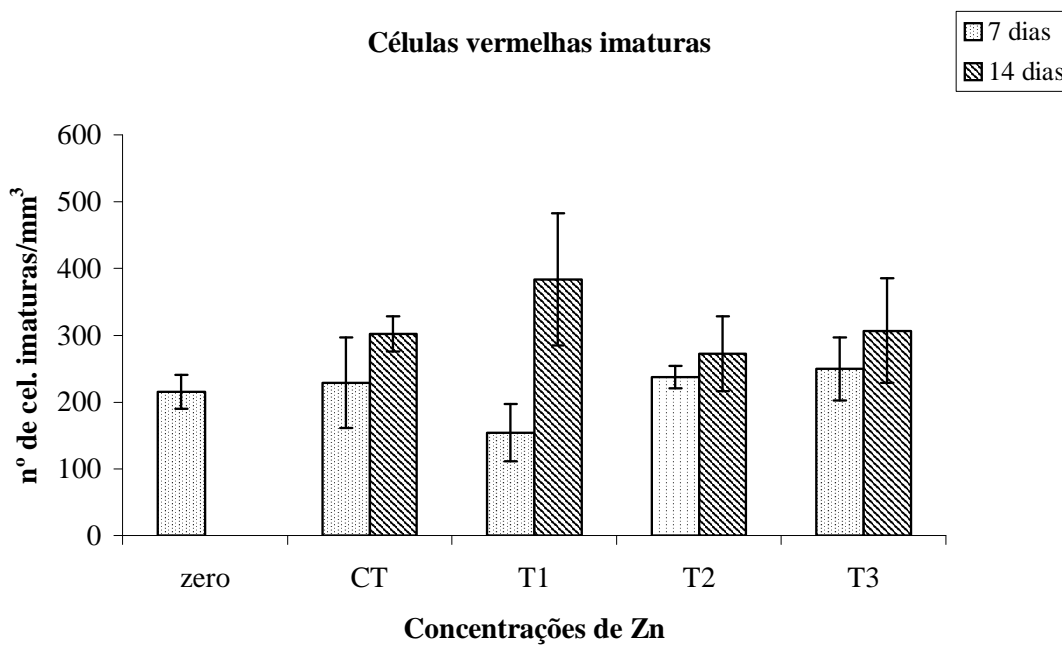


Figura 14 – Valores médios do número de células vermelhas imaturas de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de zinco

CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

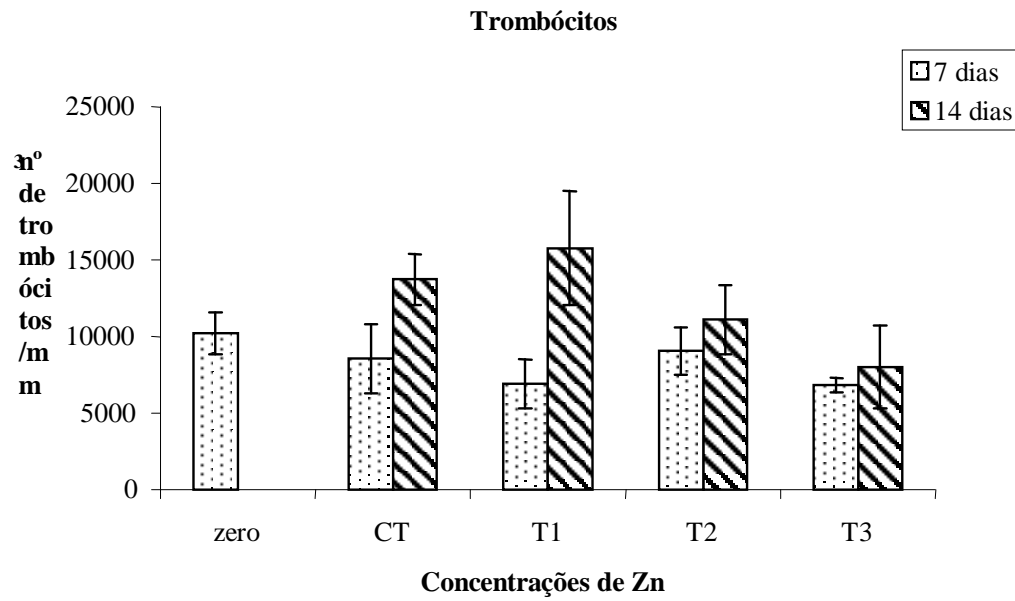


Figura 15 – Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de zinco  
CT = tratamento controle; T1=  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ;  
T3 =  $CL_{50}$

Os resultados das análises do leucograma de girinos de *R. catesbeiana* estão apresentados na Tabela 9 e Figura 16.

Nota-se, pela figura que ocorreu leucopenia leve com linfócitose no tratamento T1 (CL<sub>50</sub>/100) aos 14 dias, causada principalmente por neutropenia. Quanto ao número de neutrófilos, ocorreu neutrofilia nos tratamentos T2 (CL<sub>50</sub>/10) e T3 (CL<sub>50</sub>), aos 14 dias. Quanto aos monócitos, ocorreu monocitose no tratamento T3 aos 7 dias, indício de aumento da produção destas células, aumentando a defesa do organismo. Para mamíferos esse processo foi descrito por JANNINI e JANNINI (1978). Ocorreu basofilia nos tratamentos T2 e T3, aos 14 dias e eosinofilia no tratamento T2, indicando, provavelmente, uma reação alérgica destes animais ao zinco.

O zinco é um elemento essencial no crescimento de todos os tecidos, sendo um co-fator do DNA e RNA polimerase e parece ter uma ação modulatória e protetora no crescimento celular (HERKOVITS e HELGUERO, 1998). Além disso, foi demonstrado que ele exerce papel imunoestimulador, atuando na atividade dos glóbulos brancos produtores de anticorpos e de outras células fagocitárias e, que o seu deficit induz numerosas alterações no sistema imunológico.

No presente trabalho, parece ter ocorrido com os girinos um quadro de intoxicação não grave.

**Tabela 9** - Valores médios (x) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de zinco

<b>Trat.</b>	<b>Lc</b>	<b>Lf</b>	<b>Mn</b>	<b>Nt</b>	<b>Bs</b>	<b>Es</b>
	<b>X ± EPM</b>	<b>X ± EPM</b>	<b>X ± EPM</b>	<b>X ± EPM</b>	<b>X ± EPM</b>	<b>X ± EPM</b>
zero	13246,00 <sup>a</sup> ± 901,84	10284,00 <sup>b</sup> ± 84,70	231,94 <sup>b</sup> ± 2,97	886,19 <sup>b</sup> ± 12,84	1446,13 <sup>a</sup> ± 19,31	397,25 <sup>a</sup> ± 6,21
CT dias	7 10843,00 <sup>b</sup> ± 1244,66	6850,00 <sup>c</sup> ± 1169,00	213,00 <sup>b</sup> ± 60,00	617,00 <sup>c</sup> ± 45,00	1111,00 <sup>a</sup> ± 324,00	448,00 <sup>a</sup> ± 92,00
T1 dias	7 7583,00 <sup>c</sup> ± 1167,95	7663,00 <sup>c</sup> ± 2012,00	180,00 <sup>c</sup> ± 63,00	587,00 <sup>c</sup> ± 283,00	1240,00 <sup>a</sup> ± 386,00	342,00 <sup>b</sup> ± 191,00
T2 dias	7 8020,00 <sup>c</sup> ± 1124,80	8510,00 <sup>b</sup> ± 749,00	105,00 <sup>c</sup> ± 9,00	573,00 <sup>c</sup> ± 176,00	1091,00 <sup>a</sup> ± 115,00	157,00 <sup>c</sup> ± 33,00
T3 dias	7 7460,00 <sup>c</sup> ± 852,94	5639,00 <sup>c</sup> ± 482,00	435,00 <sup>a</sup> ± 129,00	1262,00 <sup>b</sup> ± 206,00	1325,00 <sup>a</sup> ± 308,00	248,00 <sup>b</sup> ± 61,00
CT dias	14 7417,00 <sup>c</sup> ± 912,58	8166,00 <sup>b</sup> ± 763,00	272,00 <sup>b</sup> ± 49,00	615,00 <sup>c</sup> ± 74,00	1207,00 <sup>a</sup> ± 203,00	452,00 <sup>a</sup> ± 34,00
T1 dias	14 9147,00 <sup>b</sup> ± 1532,38	12910,00 <sup>a</sup> ± 2473,00	308,00 <sup>b</sup> ± 59,00	686,00 <sup>c</sup> ± 160,00	1071,00 <sup>a</sup> ± 273,00	405,00 <sup>a</sup> ± 53,00
T2 dias	14 9141,00 <sup>b</sup> ± 912,58	7173,00 <sup>c</sup> ± 1569,00	129,00 <sup>c</sup> ± 16,00	1569,00 <sup>a</sup> ± 324,00	399,00 <sup>b</sup> ± 128,00	149,00 <sup>c</sup> ± 33,00
T3 dias	14 8073,00 <sup>c</sup>	7008,00 <sup>c</sup>	230,00 <sup>b</sup>	2216,00 <sup>a</sup>	598,00 <sup>b</sup>	414,00 <sup>a</sup>

dias	±	±	±	±	±	±
	973,70	1193,54	26,93	324,69	97,92	84,31

Lc = leucócitos totais/mm<sup>3</sup>; Lf = linfócitos/mm<sup>3</sup>; Mn = monócitos/mm<sup>3</sup>; Nt = neutrófilos/mm<sup>3</sup> ;

Bs = basófilos/mm<sup>3</sup> ; Es = eosinófilos/ mm<sup>3</sup>; CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

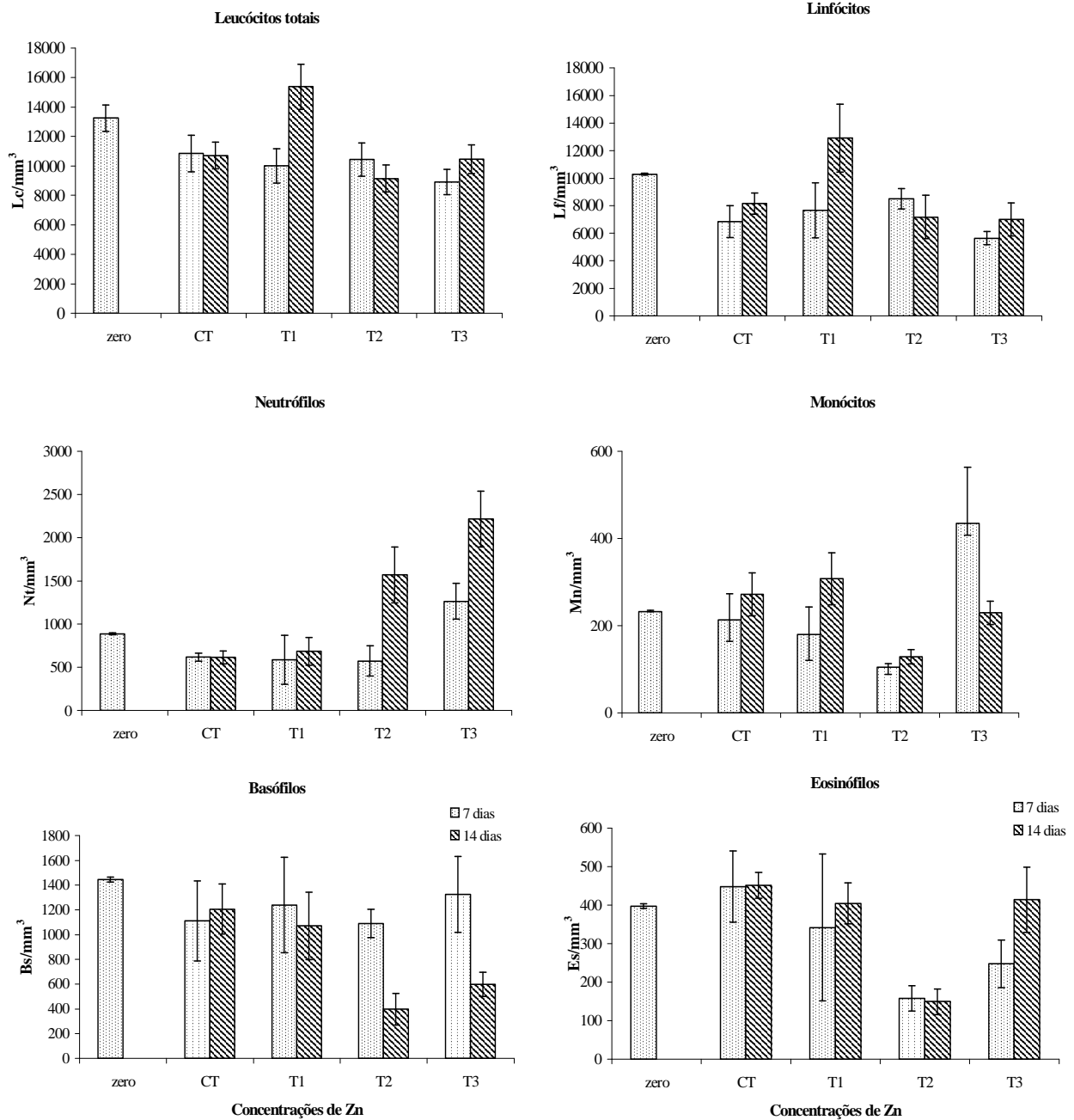


Figura 16 - Valores médios do numero de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de zinco  
 CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

#### 4.4. Toxicidade aguda de sulfato de cobre + sulfato de zinco para girinos de rã-touro

##### 4.4.1. Testes definitivos

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água quantificados no início e no final do teste definitivo de toxicidade aguda com girinos de rã-touro, foram respectivamente, os seguintes:

- temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C;
- pH:  $7,3 \pm 0,3$ ;
- condutividade elétrica:  $130 \pm 5$   $\mu$ S/cm;
- oxigênio Dissolvido =  $7,0 \pm 0,3$  mg/L
- dureza =  $70 \pm 15$  mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Os resultados obtidos atendem aos padrões de exigência para condução de testes de toxicidade com anfíbios (SCHUYTEMA e NEBEKER, 1999) e às normas de cultivo desses organismos aquáticos (CULLEY, 1991).

Os resultados dos testes definitivos de toxicidade aguda de cobre + zinco para girinos de rã-touro estão apresentados na Tabela 10 e na Figura 17.

**Tabela 10** – Porcentagens médias de mortalidade cumulativa obtidas no teste definitivo de toxicidade aguda de Cu + Zn com girinos de rã-touro, *R. catesbeiana*

<b>Tratamento (mg/L)</b>	<b>Mortalidade (%) 96h</b>
0,00	0,00
0,50	16,67
1,00	16,67
1,50	33,33
2,00	50,00
2,50	66,67
3,00	83,33
3,50	100,00

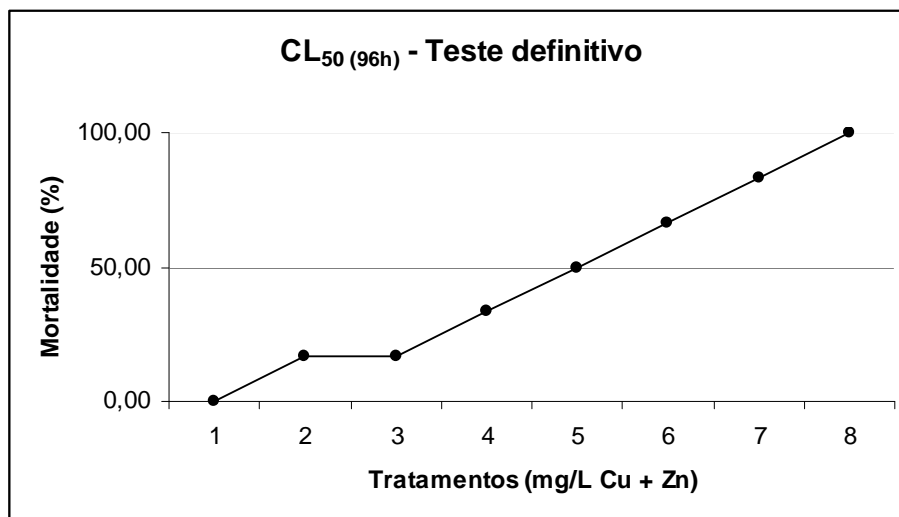


Figura 17 – Mortalidade cumulativa (%) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em 96 horas expostos ao cobre + zinco

#### 4.4.2. Determinação da $CL_{50}$

Para os girinos de rã-touro, a  $CL_{50}$ - 96 horas calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi de 1,90 mg de cobre e zinco (50%)/L água.

O efeito tóxico do zinco é reduzido também em presença de sólidos inorgânicos em suspensão, devido a fenômenos de adsorção (BRANCO, 1974b, WATER RESEARCH CENTER, 1974). Da mesma forma como ocorre com o cobre, um aumento do pH e/ou do carbono orgânico dissolvido diminui a toxicidade do zinco (HEIJERICK et al., 2003). Nas mesmas condições de pH, o zinco se mostra mais tóxico que o cobre (FRIAS-ESPERICUETA et al., 2003).

O efeito letal do zinco é por indução de danos citológicos às brânquias e a causa fisiológica da morte é a quebra dos processos respiratórios e osmorregulatório (CRESPO, 1984).

O cobre e o zinco são considerados metais essenciais para o controle da homeostase animal (SORENSEN, 1991). O cobre juntamente com o zinco, um co-fator da Cu-Zn superóxido desmutase (HERKOVITS e HELGUERO, 1998). Entretanto, pode ocorrer aumento da toxicidade do cobre quando em presença do zinco (BRANCO e ROCHA, 1984; DAMATO et al., 1989).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, mostram que os girinos de rã-touro apresentam baixo valor de  $CL_{50}$ , que indica uma menor tolerância ao cobre associado ao zinco, quando se comparam os valores de  $CL_{50}$  do cobre e de  $CL_{50}$  do zinco. Um fenômeno que pode explicar o que ocorre entre o cobre e o zinco é a adsorção competitiva, quando ambos competem pelo mesmo sítio ativo, ocorrendo inibição da absorção de zinco quando há presença de cobre. Assim, mesmo a solução de cobre e zinco estando na proporção de 1:1, haverá uma absorção maior do cobre, que apresenta valor de  $CL_{50}$  inferior ao do zinco (MEYLAN, et al., 2004).

Os dados obtidos levam a supor uma ação sinérgica do cobre associado ao zinco, onde se observa potencialização do efeito tóxico, uma vez que o valor da  $CL_{50}$  do cobre associada ao zinco obtida neste estudo, foi inferior ao valor da  $CL_{50}$  do cobre e da  $CL_{50}$  do zinco. Entretanto, HERKOVITZ e HELGUERO (1998) demonstraram os benefícios do zinco na toxicidade de cobre, mesmo estando este em concentração duas vezes mais alta que a  $CL_{50}$ . O mecanismo que explica esta constatação seria que o zinco diminui a captação, inibe a absorção do cobre, reduzindo também a quantidade deste metal no rim dos animais estudados.

#### **4.4.3. Toxicidade crônica de sulfato de cobre associado ao sulfato de zinco para girinos de rã-touro**

A toxidez do zinco, bem como a do cobre, é muito aumentada por efeito da agitação da água, que possibilita os choques das partículas coloidais do muco das brânquias acelerando sua coagulação e conduzindo os animais à morte por asfixia, já que as brânquias tornam-se impermeáveis à passagem do oxigênio e demais gases na respiração (BRANCO, 1960; BRANCO, 1974b). No caso dos girinos, como 30% da respiração ocorre via dérmica, o muco sobre a superfície corpórea pode prejudicar a troca gasosa por esse meio.

Os metais dissolvidos são supostamente mais tóxicos, porque são mais facilmente absorvidos pelos organismos aquáticos do que a fração particulada (FRIAS-ESPERICUETA et al., 2003). A toxicidade do cobre não ocorre apenas em função da concentração de íon cobre livre, especialmente na presença de outros ligantes ou complexos, em presença de sedimento. Quando há presença de sedimento, parte do cobre ficará adsorvido junto ao sedimento, ficando indisponível na água, o que reduz sua toxicidade aos organismos aquáticos. O nível de toxicidade é dependente da espécie de organismo testado (BORGMANN e RALPH, 1983).

A interação entre elementos tóxicos ou poluentes é complexa e depende dos componentes da mistura, bem como do organismo afetado (WONG e PAK, 2004). A ação tóxica do cobre e do zinco pode ser sinérgica em algumas espécies de organismos aquáticos (BREAK et al., 1976; KHANGAROT et al., 1982; VERRIOPOULOS e DIMAS, 1988) e antagônicas em outras (BREAK et al., 1976; GUDMUND e ARNE, 1976; PARROTT e SPRAGUE, 1993; OTITOLUJU, 2002).

O zinco, como o cádmio, é um antagonista do cálcio e pode causar hipocalcemia pelo impedimento de absorção de cálcio pelas brânquias (HOGSTRAND et al., 1995; SLOMAN et al., 2003). Estudos sobre os efeitos do zinco mostraram que este metal

pode afetar a estabilidade de hierarquias dominantes (HENRY e ATCHISON, 1972) e quando peixes são expostos a doses letais de zinco, os peixes dominantes apresentam maior resistência que os subordinados (SPARKS et al., 1972).

Os efeitos antagônicos de toxicidade do zinco com o cálcio e o magnésio são geralmente atribuídos pelo aumento da competição pelos sítios de ligação nos tecidos sensíveis ou uma redução da atividade iônica do metal (EPA, 1991).

Os resultados obtidos na exposição do cobre associado ao zinco, estão descritos na Tabela 11. Na figura 18 observa-se que os valores de hematócrito e de número de eritrócitos e não diferiram entre as coletas. Os valores de taxa de hemoglobina tenderam a ser mais elevados nos tratamentos em que o Cu e o Zn estavam menos concentrados, sendo os do tratamento T3 (CL<sub>50</sub>) aos 14 dias inferior aos demais tratamentos. Como o cobre e o zinco são depositados no rim e no fígado, que são órgãos eritropoiéticos em girinos (MANIATIS e INGRAM, 1971), pode ter ocorrido alterações nestes órgãos dificultando a formação das células vermelhas.

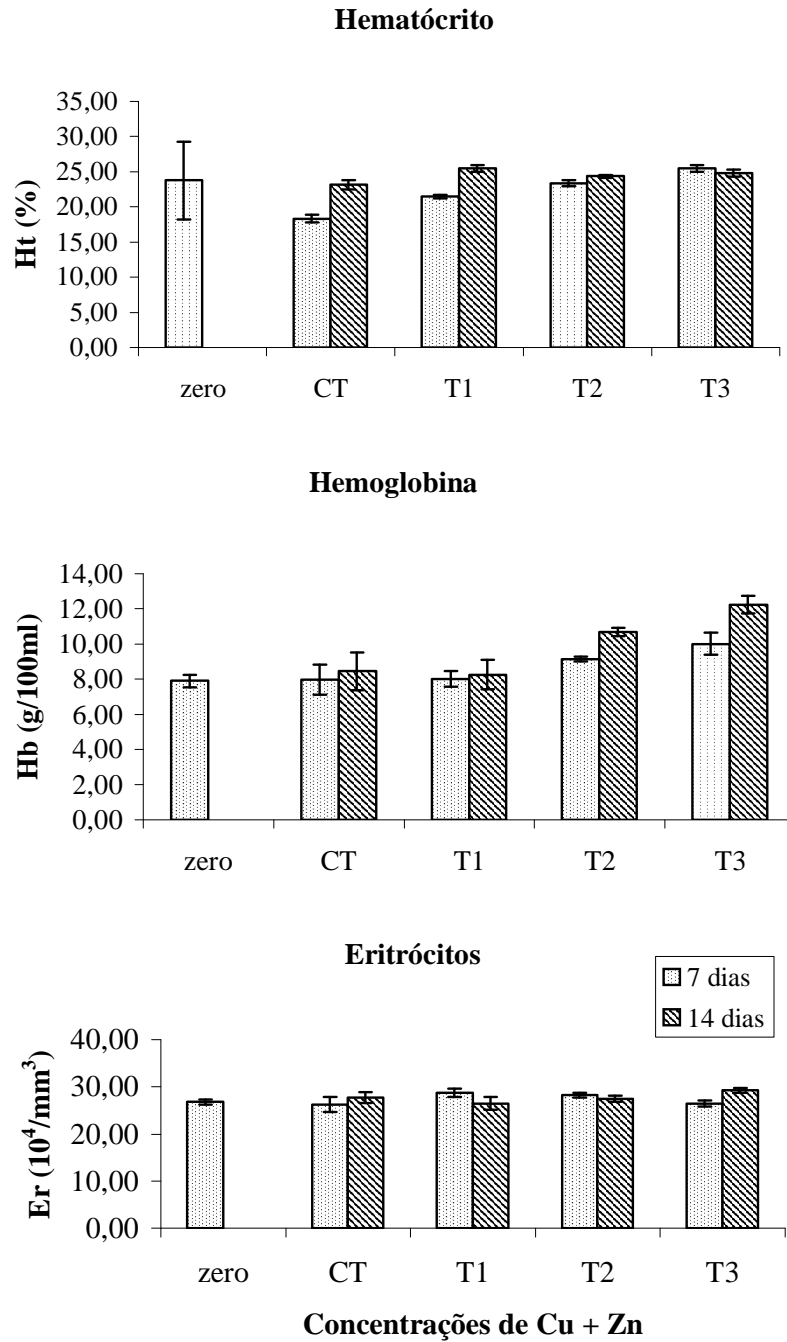
Para os valores de VCM, HCM e CHCM (Figura 19) não foi verificada diferença significativa entre as médias dos diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 11** - Valores médios ( $\bar{x}$ ) e erro padrão (EPM) dos parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de cobre + zinco

Tratamentos	Ht $\bar{x} \pm \text{EPM}$	Hb $\bar{x} \pm \text{EPM}$	Er $\bar{x} \pm \text{EPM}$	VCM $\bar{x} \pm \text{EPM}$	HCM $\bar{x} \pm \text{EPM}$	CHCM $\bar{x} \pm \text{EPM}$
zero	23,75 <sup>a</sup> ± 0,69	7,89 <sup>a</sup> ± 0,36	26,81 <sup>a</sup> ± 0,58	884,05 <sup>a</sup> ± 9,96	29,92 <sup>a</sup> ± 1,88	33,97 <sup>a</sup> ± 2,23
CT 7 dias	18,35 <sup>a</sup> ± 0,52	7,98 <sup>a</sup> ± 0,85	26,25 <sup>a</sup> ± 1,55	710,74 <sup>a</sup> ± 66,19	30,86 <sup>a</sup> ± 4,07	43,49 <sup>a</sup> ± 4,50
T1 7 dias	21,48 <sup>a</sup> ± 0,28	8,01 <sup>a</sup> ± 0,46	28,75 <sup>a</sup> ± 0,85	749,00 <sup>a</sup> ± 25,41	27,82 <sup>a</sup> ± 1,17	37,35 <sup>a</sup> ± 2,44
T2 7 dias	23,48 <sup>a</sup> ± 0,32	9,14 <sup>a</sup> ± 0,14	28,25 <sup>a</sup> ± 0,48	832,10 <sup>a</sup> ± 24,34	32,39 <sup>a</sup> ± 0,77	38,96 <sup>a</sup> ± 0,90
T3 7 dias	23,38 <sup>a</sup> ± 0,43	10,01 <sup>a</sup> ± 0,64	26,50 <sup>a</sup> ± 0,65	884,61 <sup>a</sup> ± 35,72	37,78 <sup>a</sup> ± 2,29	42,96 <sup>a</sup> ± 3,29
CT 14 dias	23,15 <sup>a</sup> ± 0,66	8,44 <sup>a</sup> ± 1,07	27,75 <sup>a</sup> ± 1,11	840,15 <sup>a</sup> ± 53,56	30,43 <sup>a</sup> ± 3,88	36,87 <sup>a</sup> ± 5,58
T1 14 dias	25,48 <sup>a</sup> ± 0,45	8,26 <sup>a</sup> ± 0,84	26,50 <sup>a</sup> ± 1,32	968,31 <sup>a</sup> ± 48,66	31,39 <sup>a</sup> ± 3,28	32,28 <sup>a</sup> ± 2,76
T2 14 dias	24,35 <sup>a</sup> ± 0,18	10,69 <sup>a</sup> ± 0,24	27,50 <sup>a</sup> ± 0,65	887,32 <sup>a</sup> ± 26,73	38,90 <sup>a</sup> ± 0,60	43,94 <sup>a</sup> ± 1,21
T3 14 dias	24,80 <sup>a</sup> ± 0,50	12,23 <sup>a</sup> ± 0,49	29,25 <sup>a</sup> ± 0,48	847,76 <sup>a</sup> ± 6,05	41,90 <sup>a</sup> ± 2,20	49,44 <sup>a</sup> ± 2,61

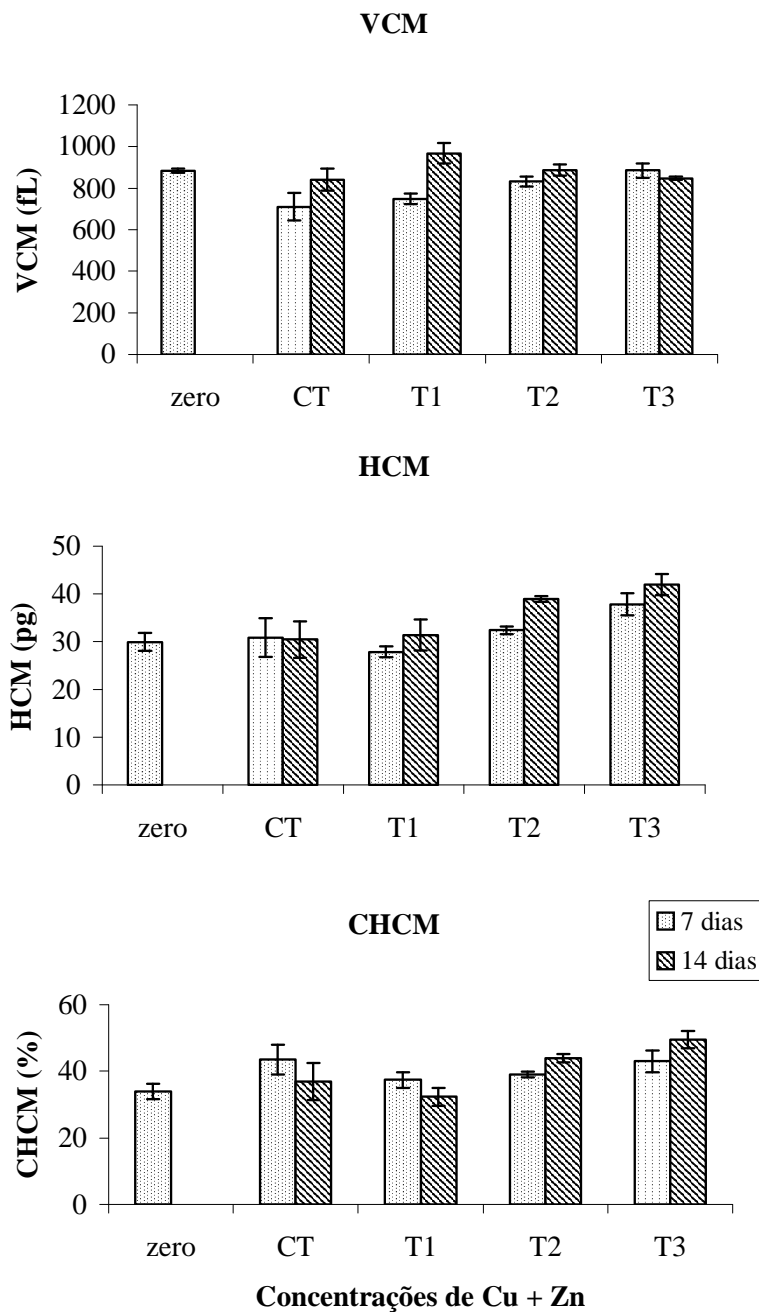
Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ( $10^4/\text{mm}^3$ ); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); CT = tratamento controle; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ )



**Figura 18** – Valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco

CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>



**Figura 19** - Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco CT = tratamento controle; T1 =  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$

Os valores médios de células vermelhas imaturas mostraram-se mais levados no tratamento T3 aos 7 e aos 14 dias (Tabela 12 e Figura 20). Esse aumento não coincidiu com diminuição da taxa de hemoglobina, como era de se esperar.

Os valores de trombócitos mostraram-se elevados no tratamento T3 na coleta aos 7 dias e na coleta aos 14 dias o valor médio apresentou-se próximo àqueles encontrados no tratamento controle (Tabela 12 e Figura 21).

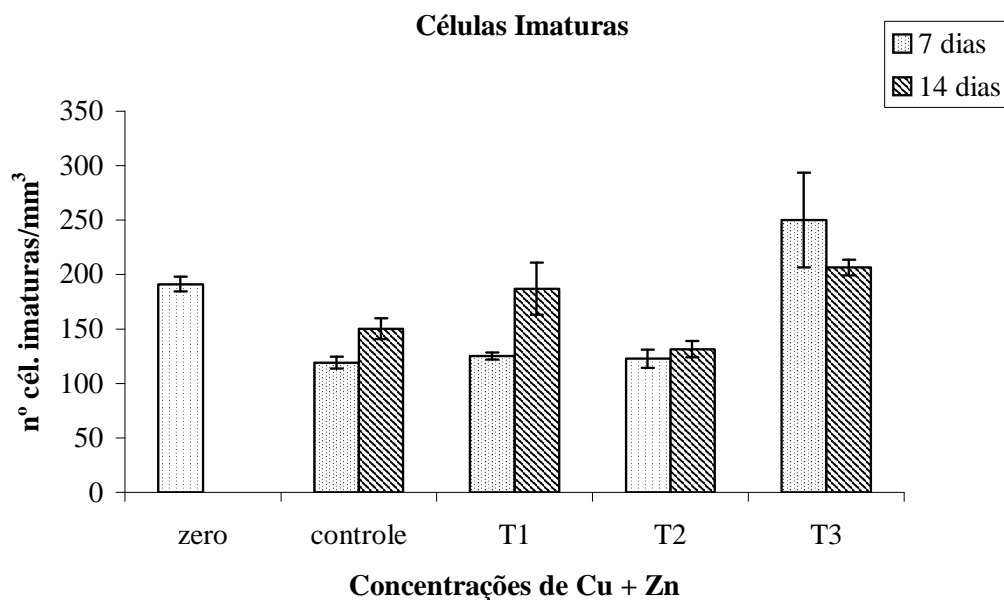
Os resultados obtidos indicam um efeito sinérgico do cobre e do zinco, como verificado por BREAK et al. (1976), KHANGAROT et al. (1982) e WONG e PAK (2004), aumentando a toxicidade dos elementos ou a sensibilidade dos organismos. Em níveis adequados, estes metais são essenciais para o controle da homeostase (SORENSE, 1991).

**Tabela 12** - Valores médios (  $\bar{x}$  ) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de células vermelhas imaturas (Imat.) e de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de cobre + zinco

<b>Tratamentos</b>	<b>Imat.</b> <b><math>\bar{x} \pm \text{EPM}</math></b>	<b>Trombócitos</b> <b><math>\bar{x} \pm \text{EPM}</math></b>
<b>zero</b>	191,13 <sup>b</sup> $\pm$ 6,71	8183,69 <sup>b</sup> $\pm$ 760,52
<b>CT 7 dias</b>	119,00 <sup>b</sup> $\pm$ 5,28	5351,50 <sup>c</sup> $\pm$ 387,39
<b>T1 7 dias</b>	125,25 <sup>b</sup> $\pm$ 3,20	5779,00 <sup>c</sup> $\pm$ 168,04
<b>T2 7 dias</b>	122,75 <sup>b</sup> $\pm$ 8,23	6353,75 <sup>c</sup> $\pm$ 521,96
<b>T3 7 dias</b>	250,00 <sup>a</sup> $\pm$ 43,54	13991,25 <sup>a</sup> $\pm$ 2528,19
<b>CT 14 dias</b>	150,25 <sup>b</sup> $\pm$ 9,50	7537,75 <sup>b</sup> $\pm$ 545,89
<b>T1 14 dias</b>	187,00 <sup>b</sup> $\pm$ 23,84	9407,50 <sup>b</sup> $\pm$ 1136,12
<b>T2 14 dias</b>	131,50 <sup>b</sup> $\pm$ 7,35	5995,00 <sup>c</sup> $\pm$ 506,59
<b>T3 14 dias</b>	206,50 <sup>a</sup> $\pm$ 7,24	6914,50 <sup>b</sup> $\pm$ 485,34

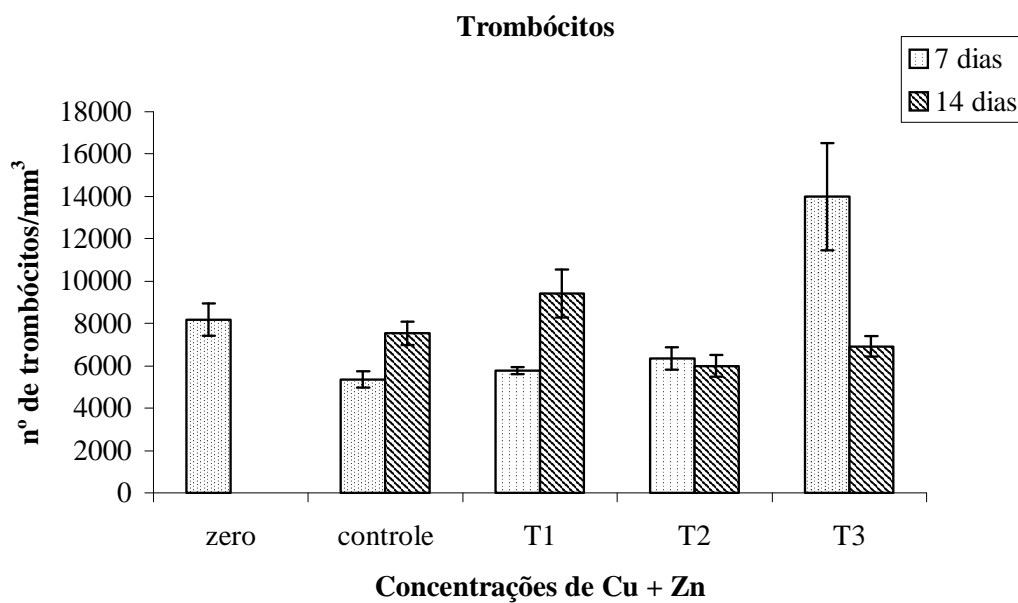
CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)



**Figura 20** – Valores médios do número de células vermelhas imaturas de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco

CT = tratamento controle; T1 =  $CL_{50}/100$ ; T2 =  $CL_{50}/10$ ; T3 =  $CL_{50}$



**Figura 21** – Valores médios do número de trombócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre + zinco

CT = tratamento controle; T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Os resultados das análises do leucograma de girinos de *R. catesbeiana* estão apresentados na Tabela 13 e Figura 22. Os valores médio dos leucócitos não variaram muito, sendo que o único valor significativo ( $p < 0,05$ ) foi a redução do número de neutrófilos no tratamento T3 (CL<sub>50</sub>) aos 14 dias, indicando neutrofilia, indicando uma reação do organismo devido à intoxicação provocada pelo cobre associado ao zinco (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994).

Os valores médios de linfócitos e de monócitos apresentaram discreto aumento no tratamento T1 (CL<sub>50</sub>/100), na coleta aos 14 dias. Os valores médios de basófilos apresentaram discreta elevação no tratamento T3 nas coletas aos 7 e 14 dias e os de eosinófilos apresentaram leve aumento no tratamento T3 na coleta aos 7 dias. Devido às pequenas variações dos valores médios de tais células entre os tratamentos e entre as coletas, pode-se considerar o perfil leucocitário quase normal.

**Tabela 13** - Valores médios ( $\bar{x}$ ) e erro padrão (EPM) dos números absolutos de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, exposto a diferentes concentrações de cobre e zinco

<b>Trat.</b>	<b>Lc</b> <b>X ± EPM</b>	<b>Lf</b> <b>X ± EPM</b>	<b>Mn</b> <b>X ± EPM</b>	<b>Nt</b> <b>X ± EPM</b>	<b>Bs</b> <b>X ± EPM</b>	<b>Es</b> <b>X ± EPM</b>
<b>zero</b>	13067,00 ± 273,78	9784,00 ± 3473,00	145,00 ± 80,00	719,00 ± 351,00	1948,00 ± 971,00	468,00 ± 389,00
<b>CT 7 dias</b>	8987,00 ± 407,85	6742,00 ± 333,00	111,00 ± 20,00	560,00 ± 17,00	1264,00 ± 116,00	310,00 ± 38,00
<b>T1 7 dias</b>	9945,00 ± 492,24	7470,00 ± 525,26	100,00 ± 5,69	572,00 ± 39,15	1502,00 ± 145,38	302,00 ± 83,39
<b>T2 7 dias</b>	9141,00 ± 748,41	6844,00 ± 527,36	115,00 ± 24,89	518,00 ± 126,27	1322,00 ± 148,19	342,00 ± 47,65
<b>T3 7 dias</b>	13250,00 ± 418,11	8547,00 ± 318,24	166,00 ± 33,44	1395,00 ± 116,69	2514,00 ± 227,25	629,00 ± 100,98
<b>CT 14 dias</b>	11406,00 ± 1201,30	8546,00 ± 886,08	114,00 ± 11,99	727,00 ± 59,93	1761,00 ± 263,79	259,00 ± 73,24
<b>T1 14 dias</b>	13900,00 ± 1824,74	10059,00 ± 1592,55	178,00 ± 47,87	765,00 ± 114,43	1986,00 ± 119,46	462,00 ± 93,70
<b>T2 14 dias</b>	9253,00 ± 537,15	6944,00 ± 424,84	93,00 ± 5,39	529,00 ± 22,69	1300,00 ± 129,85	387,00 ± 33,21
<b>T3 14 dias</b>	14515,00 ±	9334,00 ±	145,00 ±	2369,00 ±	2412,00 ±	256,00 ±

---

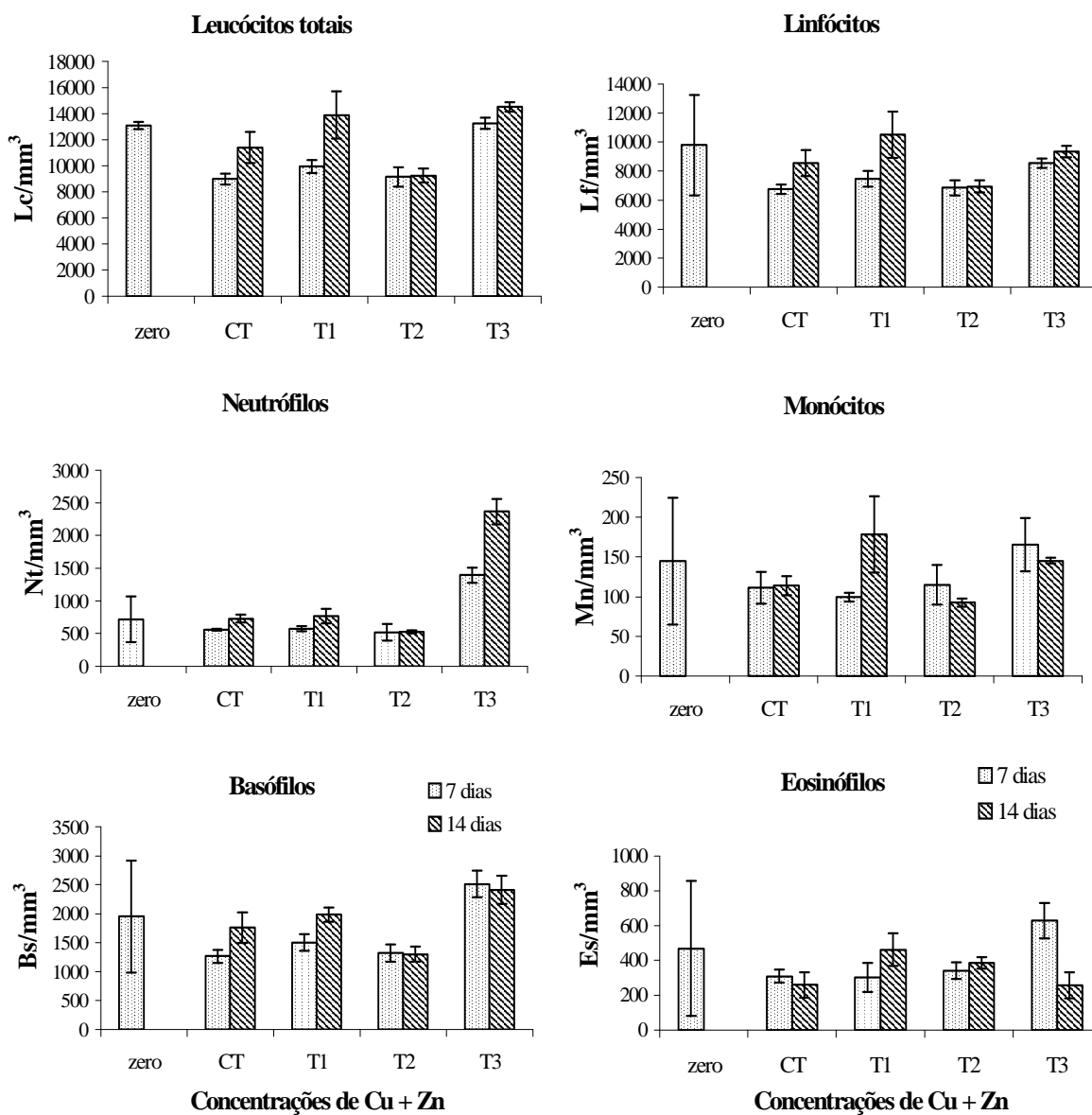
358,32	379,55	3,50	195,06	243,61	74,93
--------	--------	------	--------	--------	-------

---

Lc = leucócitos totais/mm<sup>3</sup>; Lf = linfócitos/mm<sup>3</sup>; Mn = monócitos/mm<sup>3</sup>; Nt = neutrófilos/mm<sup>3</sup> ; Bs = basófilos/mm<sup>3</sup> ; Es = eosinófilos/ mm<sup>3</sup>; CT = tratamento controle;

T1= CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)



**Figura 22** - Valores médios do numero de leucócitos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, expostos a diferentes concentrações de cobre e zinco  
 CT = tratamento controle; T1 = CL<sub>50</sub>/100; T2 = CL<sub>50</sub>/10; T3 = CL<sub>50</sub>

## 5. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- os girinos de *Rana catesbeiana*, comparativamente com outras espécies aquáticas, apresentaram alta resistência no teste de toxicidade aguda (96 horas) ao cobre, ao zinco e ao cobre associado ao zinco;
- essa resistência também foi observada na intoxicação prolongada (312 horas) com concentrações abaixo da  $CL_{50}$  durante o teste de toxicidade crônica com estes metais, mostrando-se mais sensíveis ao cobre associado ao zinco, com menor valor de  $CL_{50}$ , o que pode significar um efeito sinérgico entre estes;
- através da análise dos parâmetros hematológicos, pode-se afirmar que os girinos responderam de forma aguda, porém sem alterações significativas, ao processo de intoxicação com cobre, zinco e cobre associado ao zinco.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFLECK, R.J. Zinc poisoning in a trout hatchery. **Austral. Jour. Mar. Fresh. Res.**, v.3, p.1942-1969, 1952.
- AHSANULLAH, M.; YING, W. Toxic effects of dissolved copper on *Penaeus merguensis* and *Penaeus monodon*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.55, p.81-88, 1995.
- ALSOP, D.H.; WOOD, C.M. Influence of waterborne cations on zinc uptake and toxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.56, p.2112-2119, 1999.
- ANDREI, E. (Ed) **Compêndio de agrotóxicos agrícolas**. 4ª ed. São Paulo: Editora. 1993, p.130-131.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17ª ed., Washington. D.C., p. 81-143, 1989.
- ARELLANO, J.M.; STORCHT, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecot. Env. Saf.**, v.44, n.1, p.62-72, 1999.
- ARREGHINI, S.; CABO, L.; IORIO, A. F.; BONETTO, A. R. Effects of Zinc on the Growth of Bulrush (*Schoenoplectus californicus*) and its Distribution Between Different Sediment Fractions. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.67, p.264-270, 2001.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians**. Philadelphia, 1980. 780p.
- BAKER, J.T.P. Histological and electron microscopical observation on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v.26, p.2785-2793, 1969.
- BARATA, C.; BAIRD, D.J.; MARKICH, S.J. Influence of genetic and environmental factors on the toxicity of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. **Aquat. Toxicol.**, v.42, p.115-137, 1998.

- BARBER, D.L.; WESTERMANN, J.E.M. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* Lönnberg: light and electron microscopic observations. **J. Fish Biol.**, v.19, p.11-28, 1981.
- BASSOI, L.J.; NIETO, R.; TREMAROLI, D. **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, CETESB: série Manuais, nº8, 7p., 1990.
- BELANGER, S.E.; CHERRY, D.S. Interacting effects of pH acclimation, pH and heavy metals on acute and chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera). **J. Crustac. Biol.**, v.10, p.225-235, 1990.
- BENGSTON, B.; LARSSON, A. Vertebral deformities and physiological effects in fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) after long-term exposure to a simulated heavy metals containing effluent. **Aquat. Toxicol.**, v.9, p.215-229, 1986.
- BENNETT, W.A.; SOSA, A.; BEITINGER, T.L. Oxygen tolerance of fathead minnows previously exposed to copper. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.55, p.517-524, 1995.
- BILLIARD, R.; BRY, C.; GILLET, C. Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fishes**, London: Academic Press, 1981, p.185-207.
- BLAXHALL, P.C. Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes. **J. Fish Biol.**, v.22, p.223-229, 1983.
- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. **J. Fish Biol.**, v.5, p.771-781, 1973.
- BOOCK, M.V. **Estudo toxicológico comparativo da toxicidade do oxiclureto de cobre em tilápia vermelha (*Oreochromis spp*) e guaru (*Poecilia reticulata*)**. Dissertação (Mestre) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP: 2000. 69p.
- BOOMKER, J. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south Africa freshwater fish. II. Erythrocytes and thrombocytes of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.47, p.95-100, 1980.

- BOOMKER, J. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south Africa freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.48, n.4, p.185-193, 1981.
- BORGMANN, V.; RALPH, K.M. Complexation and íon toxicity of copper and the free metal bioassay technique. **Water Res.**, v.17, p.1697-1703, 1983.
- BOYD, C. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Auburn University, 1990. 482p.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Pond aquaculture water quality management**. 1. ed., Northwell, MA.:Klower, 1998, 215p.
- BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v. 20, p.113-132, 1999.
- BRADLEY, R.W.; SPRAGUE, J.B. The influence of pH, water, hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.42, p.731-736, 1985.
- BRANCO, S.M. Observações sobre o comportamento de peixes em presença de certos compostos metálicos dissolvidos na água. **Revista DAE**, v.21, n.37, p. 37-41, 1960.
- BRANCO, S.M. **Poluição e intoxicação de peixes**. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, 1970.216p.
- BRANCO, S.M. Efeitos da poluição sobre a exploração de recursos naturais vivos. **Revista DAE**, v.35, n.101, p.37-41, 1974a.
- BRANCO, S.M. Transferência e transformações de poluentes nas cadeias alimentares e ecossistemas aquáticos. **Revista DAE**, v.35, n.101, p.27-31, 1974b.
- BRANCO, S.M.; ROCHA, A.A. **Elementos de Ciências do Ambiente**. 2ª Ed., São Paulo, Ascetesb, 1987. 206p.
- BREAK, G.S.; JENSEN, A.; MOHUS, A. Heavy metals tolerance of marine phytoplankton III. Combined effects of copper & zinc íons on cultures of four common species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.25, p.37-50, 1976.

- BRZÓSKA, M.M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p. 967-980, 2001.
- BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Tadpole Epithelium Test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.67, p.202-209, 2001.
- BURGER, J.; SNODGRASS, J. Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah River Site: location and body compartment effects. **Environ. Res.**, v.86, n.2, p.157-166, 2001.
- CALAMARI, D.; MARCHETTI, R.; VAILATI, G. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri*. **Rich Water Res.**, v.14, p.1421-1426, 1980.
- CANNON, M.S.; SAMPSON, H.W.; KAPES, E.D. The blood leukocytes of *Bufo marinus*: a light, phase-contrast and histochemical study. **Can. J. Zool.**, v.65, p.1445-1453, 1987.
- CARDEILHAC, P.T.; WHITAKER, B.R. Copper treatments: uses and precautions. **Vet. Clin. North Am.**, v.18, p.435-448, 1988.
- CASILLAS, E.; SMITH, L.S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish Biol.**, Huntingdon, v.10, n.5, p.481-491, 1977.
- CHAKOUMAKOS, C.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH, and hardness. **Am. Chem. Soc.**, v.13, p.213-219, 1979.
- CHANG, C.; HAMILTON, P.B. The thrombocytes as the primary circulating phagocyte in chickens. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v.25, p.585-590, 1979.
- CLAYTON, G.D.; CLAYTON, F.E. **Patty's Industrial Hygiene and Toxicology**. 4<sup>th</sup> Ed., New York, John Wiley; Sons, 1994.
- CLEVEN, R.F.M.J.; VAN LEEUWEN, H.P. Electrochemical analysis of the heavy metal/humic acid interaction. **J. Environ. Anal. Chem.**, v.27, p.11-28, 1986.
- COLE, H.A. **Marine pollution and the living resources of the sea. Population and Pollution**. Proceedings of the Eight Annual Symposium of the Eugenics Society – London. 1972.

- COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Ass.**, v.50, p.550-552, 1944.
- CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente.
- COOKE, G.D.; WELCH, E.B.; PETERSON, S.A.; NEWROTH, P.R. **Restoration and Management of Lakes and reservoir.** 2ª Ed., Washington, DC, Butterworths Publisher, 1993. 350p.
- CRESPO, S. An in vitro study of the effects of zinc on osmoregulatory processes. **Mar. Pollut. Bull.**, v.15, p.341-342, 1984.
- CRUMP, M.L.; HENSLEY, F.R.; CLAR, K.L. Apparent Decline of the Golden Toad: Uderground or Extinct ? **Copeia**, v.2, p.413-420, 1992.
- CULLEY, D.D. Edible frogs. In: MASON, I.L. **Evolution of domesticated animal.** Longman, New York, p.370-374, 20ª ed., 1991.
- CUSIMANO, R.F.; BRAKKE, D.F.; CHAPMAN, G.A. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo girdneri*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.43, p.1497-1503, 1986.
- CUVIN-ARALAR, M.L. Survival and heavy metal accumulation of two *Oreochromis niloticus* (L.) strains exposed to mixtures of zinc, cadmium and mercury. **Sci Total Environ.**, v.148, n.1, p.31-38, 1994.
- CYRIAC, P.J.; ANTONY, A.; NAMBISAM, P.N.K. Hemoglobin and hematocrit values in the Fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. **Bull. of Envir. Cont. Toxicol.**, v.43, p.315-320, 1989.
- DaMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; SOUZA, W. Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.30, n.2, p.271-277, 1998.
- DaMATTA, R.A.; MANHÃES, L.D.S.; LASSOUNSKAIA, E.; SOUZA, W. Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned médium delays apoptosis. **Tissue & Cell**, v.31, n.3, p.255-263, 1999.
- DAMATO, M.; BEYRUTH, Z.; MUCCI, J.L.N.; ALVARENGA, C.D.; ROCHA, A.A. O sulfato de cobre como agente tóxico. **Ambiente**, v.3, n.1, p.26-31, 1989.

- DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. **Mut. Research**, v.175, p.67-71, 1986.
- DAVIES, P.H.; GOETTL, J.P.; SINLEY, J.R.; SMITH, N.F. Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. **Water Res.**, v.10, p.199-206, 1976.
- DIAS, C. F. S. **Retenção do cátion do sulfato de cobre nos compartimentos biótico e abiótico de mesocosmos com sistema de fluxo contínuo de água.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, UNESP – Jaboticabal – SP: 2003.66p.
- DIAS, J.L.C. **Influência da temperatura sobre a resposta celular inflamatória induzida experimentalmente por corpo estranho na cauda de girinos de rã-touro gigante, *Rana catesbeiana*.** Dissertação (Mestre). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP – SP, São Paulo, 1989, 68p.
- DIAS, J.L.C. **Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802).** São Paulo, 1992. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- DIAS, J.L.C.; SINHORINI, I.L. Qualitative evaluation of the inflammatory response modulated by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. **Ciênc. Cult.**, v.43, p.304-306, 1991.
- DODD, M.H.I.; DODD, J.M. The biology of metamorphosis. In: DODD, M.H.I.; DODD, J.M. **Physiology of the Amphibia**, v.III, ed. B. Lofs, New York: Academic Press, p.467-600, 1976.
- DOGGETT, T.A.; WRATHMELL, A.B.; HARRIS, J.E. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. **J. Fish Biol.**, Huntingdon, v.31, n.2, p.147-153, 1987.

- EISLER, R. Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. **US Geological Survey**, Biological Resources Division, **Biological Science Report**, p.1-76, 1998.
- ELER, M.N. **Efeito da densidade de estocagem de peixes e do fluxo de água na qualidade da água e na sucessão do plâncton em viveiros de piscicultura**. Tese (Doutorado). USP, São Carlos, SP: 2000.258p.
- ELLIS, M.M. Detection and Measurement of Stream Pollution. **Bull. Bur. Fisheries**, v.48, n.22, p.365-437, 1937.
- EPA – USA. **Technical Support Document for Water Quality-Based Toxics Control**. EPA 505-2-90-001. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency. 1991.
- ERIKSSON, S.P.; WEEKS, J.M. Effects of copper and hypoxia on two populations of the benthic amphipod *Corophium volutator* (Pallas). **Aquatic Toxicology**, v.29, p.73-81, 1994.
- EVERALL, N.C.; MACFARLANE, N.A.A.; SEDGWICK, R.W. The interactions of water hardness and pH with the acute toxicity of zinc to the brown trout, *Salmo trutta* L. **J. Fish Biol.**, v.35, p.27-36, 1989.
- FELLERS, G.M.; DROST, C.A. Disappearance of the cascades frogs *Rana cascadae* to the southern end of its range, ia, USA. **Biol. Conserv.**, v.65, p.177-181, 1993.
- FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas**. São Paulo, 2002. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, C.M.; BUENO-GUIMARÃES, H.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SOARES, S.R.C.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). **Rev. Bras. Toxicol.**, v.16, n.2, p.83-88, 2003.
- FERREIRA, C.M.; LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, J.G.; BUENO-GUIMARÃES, H.M.; SOARES, S.R.C.; SALDIVA, P.H.N. Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.73, p.465-470, 2004.

- FINN, J. **Saving Fish from metal Poisons**. Eng. News-Record, v.125, n.9, 1940.
- FINN, J.P., NIELSON, N.O. The inflammatory response of rainbow trout. **J. Fish Biol.**, v. 3, p. 463-478, 1971.
- FONTANELLO, D.; WIRZ, R.R.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S. Ganho de peso de ras touro (*Rana catesbeiana*) criadas em gaiolas individuais de diferentes tamanhos. **Bol. Inst. Pesca**, v.15, n.1, p.45-49, 1988.
- FRIAS-ESPERICUETA, M.G.; VOLTOLINA, D.; OSUNA-LÓPEZ, J.I. Acute Toxicity of Copper, Zinc, Iron, and Manganese and of the Mixtures Copper-Zinc and Iron-Manganese to Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.71, p.68-74, 2003.
- FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; KESSLER, E.; VOUK, V.B. **Handbook of the Toxicology of Metals**. 2 Ed., Elsevier Science Publishers B.V., v.I, II, Amsterdam, 1986.
- FUJIMAKI, Y.; ISODA, M. Fine-structural study of leucocytes in the goldfish, *Carassius auratus*. **J. Fish Biol.**, v.36, p.821-831, 1990.
- FULOP, G.M.I.; McMILLAN, D.B. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. **J. Morphol.**, v. 179, p.175-195, 1984.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. Livraria Varela, 169p. 1994.
- GARDNER, R.G.; YEVICH, P.P. Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. **J. Fish. Res. Bd.**, v.26, p.433-447, 1969.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **Amer. J. Clin. Path.**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.
- GOODMAN, J.R. Toxicity of zinc for rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). **Califórnia Fish and game**, v.37, p.191-194, 1951.
- GOSNER, K.L. A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, p.183-190, 1960.
- GRECCHI, R.; SALIBA, A.M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potencial of fowl mononuclear phagocytes and trombocytes in vivo and in vitro. **J. Pathol.**, v.130, p.23-31, 1980.

- GREENHOUSE, G. The evaluation of toxic effects of chemicals in fresh water by using frog embryos and larvae. **Environ. Pollut.**, v.11, p.303-315, 1976.
- GROMYSZ-KALKOWSKA, K.; SZUBARTOWSKA, E. Changes in the blood of *Rana temporaria* L. after different doses of trichlorfon. *Folia Biol.*, v.34, p.21-33, 1986.**
- GUDMUND, S.B.; ARNE, J. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton III. Combined effects of copper & zinc ions on cultures of four common species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.25, p.37-50, 1976.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v.7, p.714-719, 1977.
- HANSON, M.J.; STEFAN, H.G. Side effects of 58 years of copper sulfate treatment of the Fairmont Lakes, Minnesota. **Water Res. Bull.**, v.20, p.889-900, 1984.
- HARRIS, J.A. Seasonal variations in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. **Comp. Bioch. Physiol.**, v.43A, p.975-989, 1972.
- HEATH, A.G. Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100C, p.559-564, 1991.
- HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. CRC Press, Boca Raton, 1995, p.245.
- HEIJERICK, D.G.; SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.21, n.6, p.1309-1315, 2002.
- HEIJERICK, D.G.; JANSSEN, C.R.; DE COEN, W.M. The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: development of a surface response model. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.44, p.210-217, 2003.
- HELLAWELL, J.M. Toxic substances in river and streams. **Environ. Pollut.**, v.50, p.61-85, 1988.

- HENRY, M.G.; ATCHISON, G.J. Influence of social rank on the behaviour of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque exposed to sublethal concentrations of cadmium and zinc. **J. Fish Biol.**, v.15, p.309-315, 1979.
- HERKOVITS, J.; HELGUERO, L.A. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibians embryos. **Sci. Total Environ.**, v.221, p.1-10, 1998.
- HINES, R.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for same normal israeli mirror carp. **Israeli J. Aquaculture – Bamidgeh**, v.22, p.106-113, 1970.
- HOGSTRAND, C.; REID, S.D.; WOOD, C.M. Ca<sup>2+</sup> versus Zn<sup>2+</sup> transport in the gills of freshwater rainbow trout and the cost of adaptation to waterborne Zn<sup>2+</sup>. **J. Exp. Biol.**, 198, p.337-348, 1995.
- HOWARTH, R.S.; SPRAGUE, J.B. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Water Res.**, v.12, p.455-462, 1978.
- HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 5<sup>a</sup> ed., p.1120-1125, 1998.
- JANINI, P. e JANINI, F., P. **Interpretação clínica do hemograma**. 10a. ed., São Paulo: Sarvier, 625 p. 1990.
- JAKOWSKA, S. Algunos problemas em hematologia comparada. **Rev. Biol. Trop.**, v.7, n.2, p.143-155, 1959.
- JOHNSON, W.W.; FINLEY, M.T. **Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates**. Washington, D.C., U.S. Fish Wildlife Service. Res. Pub. 137, 1980, 89p.
- JONES, J.R.E. The Relation between the Electrolytic Solution Pressures of the Metals and the Toxicity to the Stickleback (*Gasterosteus aculestus* L.). **Jour. Exp. Biol.**, v.16, p.425-437, 1939.
- KALASHNIKOVA, Z.M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **J. Ichthyol.**, Washington, v.3, n.16, p.459-472, 1976.

- KALLANAGOUDAR, Y.P.; PATIL, H.S. Influence of water hardness on copper, zinc and nickel toxicity to *Gambusia affinis* (B & G). **J. Environ. Biol.**, v.18, p.409-413, 1997.
- KHANGAROT, B.S.; MATHUR, S.; DURVE, V.S. Comparative toxicity of heavy metals and interaction of metals on a freshwater pulmonate snail, *Lymnaea acuminata* L. **Acta Hydrochem. Hydrobiol.**, v.10, p.367-375, 1982.
- KIM, S.D.; MA, H.; ALLEN, H.E.; CHA, D.K. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.18, p.2433-2437, 1999.
- KLEEREKOPER, H. **A Case of Mortality of Fish and its Cause**. Serv. Inform. Agric., Min. Agric., Rio de Janeiro, Brasil, 25p. 1946.
- KRAUTER, P.W. Micronucleus incidence and hematological effects in Bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene. **Arch. Environ. Cont. Toxicol.**, v.24, p.487-493, 1993.
- KRAUTER, P.W.; ANDERSON, P.W.; HARRISON, F.L. Radiation-Induced micronuclei in peripheral erythrocytes of *Rana catesbeiana*: An aquatic animal model for *in vivo* genotoxicity studies. **Env. Mol. Mutagen.**, v.10, p.285-296, 1987.
- LARINI, L. **Toxicologia**, Editora Manole Ltda, 1º edição, 1970, 281p.
- LAURÉN, D.J., McDONALD, D.G. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.43, p.1488-1496, 1986.
- LEGER, L. Études sur l'action nocive des produits de déversements industriels chimiques dans les eaux douces. 2º série. Eaux de décapage des métaux. **Ann. Univ. Grenoble**, v.24, p.41-122, 1912.
- LEWIS, R.J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 12ª ed., NY, Van Nostrand Reinhold Company, 1993.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A Criação de Rãs**, 2ºed., São Paulo: Globo, 187p., 1989.
- LOMBARDI, J.V. **Toxicidade aguda de pesticidas para o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* de Man (DECAPODA, PALAEMONIDAE)**. Rio Claro: UNESP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Unesp, 1999. 101p.

- LOMBARDI, J.V.** *Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M. e LIZAMA, M.A.P. Sanidade de Organismos Aquáticos, Editora Varela, p.263-272, 2004.*
- LOMBARDI, J.V.; PERPÉTUO, T.R.; FERREIRA, C.M.; MARQUES, H.L.A.** *Toxicidade aguda do Cuprocarb® – 500 (Oxicloreto de cobre) para girinos de Rana catesbeiana Shaw, 1802. Rev. Bras. Toxicol., v.12, n.1, p.29, 1999.*
- LÓPEZ-RUIZ, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J.** *Blood cells of the gilthead seabream (Sparus aurata L.): light and electron microscopical studies. Anat. Rec., v.234, p.161-171, 1992.*
- LORENZI, T.F.** *Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo, MDSI. 1999, 641p.*
- LORZ, H.W.; McPHERSON, B.P.** *Effects of Copper and zinc in freshwater fish on the adaptation to sea water and ATPase activity, and effects of copper on migratory disposition of coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Fish. Res. Board. Can., v.1, p.2023-2030, 1976.*
- MA, H.; KIM, S.D.; CHA, D.K.; ALLEN, H.E.** *Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to Ceriodaphnia dubia. Environ. Toxicol. Chem., v.18, p.828-832, 1999.*
- MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.I.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W.** *Peritoneal inflammatory cells in plaice, Pleuronectes platessa L.: effects of stress and endotoxin. J. Fish Biol., v. 25, n. 1, p. 69-81, 1984.*
- MACFIE, S.M.; TARMOHAMED, Y.; WELBOURN, P.M.** *Effect of cadmium, cobalt, copper and nickel on the growth of the green alga Chlamydomonas reinhardtii: The influence of cell wall and pH. Arch. Environ. Contam. Toxicol., v.27, p.454-458, 1994.*
- MACKAY, D.; FRASER, A.** *Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. Environ. Poll., v.110, p.375-391, 2000.*

- MANIATIS, G.M.; INGRAM, V.M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. I. Sites of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v.49, p.372-379, 1971.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v.33, n.1, p.5-10, 1996.
- MAZON, A.F. **Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. 160p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. 1997.
- MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.; MONTEIRO, E.A.S.; FERNANDES, M.N. Acute copper exposure in freshwater fish: Morphological and physiological effects. In: **Biology of Tropical Fishes**. Manaus: INPA, 1999, v.1, p. 263-275.
- MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae) p.327-340. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; NETO, A.L.O., **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. 1.ed. São Carlos, RIMA, 2000. 575p.
- MEYLAN, S.; BEHRA, R.; SIGG, L. Influence of Metal Speciation in Natural Freshwater on Bioaccumulation of Copper and Zinc in Periphyton: A Microcosm Study. **Environ. Sci. Technol.**, v.38, p.3104-3111, 2004.
- MURTY, A.S. **Toxicity of pesticide to fish**. v.1. Department of Zoology, University Nagarjunanagar, Nagarjuna, India, 3rd ed., p.178, 1988.
- NAOUM, P.C.; NAGEL, A.A.; SILVA, F.S. Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em *Bufo paracnemis* (Amphibia – Anura). **Ciênc. Cult.**, v.38, p.883-892, 1986.
- NAS - NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants**. COOPER. Triângulo, São Paulo, SP, 1977.
- O'HARA, J. Alterations on oxygen consumption by bluegills exposed to sublethal treatment with copper. **Water Res.**, v.5, p.321-327, 1971.

- OMOREGIE, E.; ESEYIN, T.G.; OFOJEKWU, P.C. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Asian Fish. Sci.**, v.7, p.1-6, 1994.
- OSHIMA, S. On the toxic action of dissolved salts and their ions upon young eels (*Anguilla japonica*). **Journ. Imper. Fish. Exp. Sta.**, n.2, p.139-193, 1931.
- OTITOLOJU, A.A. Evaluation of the joint action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.). **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.53, p.404-415, 2002.
- PANDEY, K.C.; PANDEY, A.K. Hematology of a cat fish *Rita rita* (Ham.). **Proc. Indian Acad. Sci.**, v.85B, n.6, p.369-377, 1977.
- PARROTT, J.L.; SPRAGUE, J.B. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metal and organic chemicals determined by microtox and by DNA, RNA and protein content of fathead minnows *Pimephales promelas*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.50, p.2245-2253, 1993.
- PAULAUSKIS, J.D.; WINNER, R.W. Effects of water hardness and humic acid on zinc toxicity to *Daphnia magna* Straus. **Aquat. Toxicol.**, v.12, p.273-290, 1988.
- PECHMANN, J.H.K.; SCOTT, D.E.; SEMLITSCH, R.D.; CALDWELL, J.P.; VITT, L.J.; GIBBONS, J.W. Declining Amphibia Populations: The Problem of Separating Human Impacts from Natural Fluctuations. **Science**, v.253, p.892-895, 1991.
- PELGROM, S.M.G.J. Interactions between Koper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. **Aquat. Toxicol.**, v. 30, p. 117-135, 1994.
- PELGROM, S.M.G.J.; LAMERS, L.P.M.; LOCK, R.A.C.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia. **Environ. Pollut.**, v.90, n.3, p.415-423. 1995.
- PELLIZZON, C.H.; LUNARDI, L.O. Endocytic activity in the turtle *Phrynops hilarii* (Freshwater South American species). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.32, n.4, p.651-656, 2000.
- PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v.33, n.1, p.15-18, 1996.

- POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. Identificação e controle da rubelose em mogno-africano no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém - PA. Comunicado Técnico nº68, julho, 2002.
- RAND, G.M.; PETROCELI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: 1985. 665p.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (Lat. 25°00'S Long.47°55'W). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.22, n.1, p.23-40, jan./jun.1995.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M. Haematological characteristics of freshwater-reared and wild mullet, *Mugil platanus* (Günther, 1880) (Osteichthyes, Mugilidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.13, n.3, p.561-568, 1996.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M. e LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Editora Varela, p.89-120, 2004.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; EIRAS, A.C.; RODRIGUES, E.L.; VEIGA, M.L.; SILVEIRA, V.R. Análise hematológica em machos de *Salmininus maxillosus* Valenciennes, 1840 (pisces, Characidae) do rio Mogi-Guaçu, SP. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA, 7, São Paulo, 1998. **Resumos...**p.06.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **B. Inst. Pesca**, v.25, p.77-83, 1998/1999.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, A.C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p.507-513, 2000.
- REDDY, P.S.; BHAGYALAKSHMI, A. lipid peroxidation in the gill and hepatopancreas of *Ozietelphusa senex senex* Fabricius, during cadmium and copper exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.53, p.704-710, 1994.
- RIEMER, D.N.; TOTH, S.J. Absorption of copper by clay minerals, humic and bottom muds. **J. Am. Wat. Works Ass.**, v.62, n.3, p.195-197, 1970.
- RIBEIRO, W.R. **Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1978, 137p.

- ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.329-334, 1947.
- RUSHTON, W. **Biological Notes**. Salmon and Trout Mag., n.28, p.42-51, 1922.
- RUSHTON, W. Biological Notes. Salmon and trout Mag., n.125, p.57-61, 1949.
- SCHLENK, D.. Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p. 390-396, 1998.
- SCHUBAUER-BERIGAN, M.K.; DIERKES, J.R.; MONSON, P.D.; ANKLEY, G.T. pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.12, p.1261-1266, 1993.
- SCHÜTT, D.A.; LEHMANN, J.; GOERLOCH, R.; HAMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I. Blood parameters and light microscopy of blood cells. **J. Appl. Ichthyol.**, v.13, p.83-89, 1997.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L.; WILSON, K.N. Teratogenesis, Toxicity, and Bioconcentration in Frogs Exposed to Dieldrin. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.21, p.332-350, 1991.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L. Toxicity of Guthion and Guthion 2S to *Xenopus laevis* embryos. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.27, p.250-255, 1994.
- SENDACZ, S.; KUBO, E. Zooplâncton de reservatório do alto do Tietê, Estado de São Paulo. In: **Ecologia de Reservatórios. Estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu, FAPESP, 1999. p.511-529.
- SLOMAN, K.A.; BAKER, D.W.; HO, C.G.; McDONALD, D.G.; WOOD, C.M. The effects of trace metal exposure on agonistic encounters in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquat. Toxicol.**, v.63, p.187-196, 2003.

- SOLA, S.; ISAIA, J.; SONI, A.M. Effects of copper on gill structure and transport function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Appl. Toxicol.**, v.15, n.5, p.391-398, 1995.
- SOLBÉ, J.F. The relation between water quality and the status of fish populations in Willow Brook. **Water Treatment and Examination**, v.22, p.41-61, 1973.
- SORENSEN, E.M.B. **Metal Poisoning in Fish**. CRC Press, Boston. 1991.
- SPARKS, R.E.; WALLER, W.T.; CAIRNS, J. Effect of shelters on the resistance of dominant and submissive bluegills (*Lepomis macrochirus*) to a lethal concentrations of zinc. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v.29, p.1356-1358, 1972.
- SPRAGUE, J.B. Avoidance behaviour of rainbow trout to zinc sulphate solutions. **Water Res.**, v.2, p.367-372, 1968.
- STAGG, R.M.; SHUTTLEWORTH, T.J. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. **J. Fish Biol.**, v.20, p.491-500, 1982.
- STORER, T.I.; USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.
- SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **J. Fish. Biol.**, v.29, n.3, p.349-364, 1986.
- SZUBARTOWSKA, E.; KALKOWSKA, K.G.; WÓJCIK, K. Behavior of the formed blood elements in *Rana esculenta* L. after repeated contacts of the animal with a therapeutic dose of Foschlor. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.45, p.796-803, 1990.
- TARZWELL, C.M. Dissolved Oxygen Requirements for Fishes, in **Oxygen Relationships in Streams**. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Cincinnati, U.S.A. 194p., 1958.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144p.

- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **B. Inst. Pesca**, v.27, n.1, p.43-48, 2001.
- THUVANDER, A.; NORRGREN, L.; FOSSUM, C. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. **J. Fish Biol.**, v.31, p.197-208, 1987.
- TOMAZELLI, A.C. **Estudo comparativo das concentrações de cádmio, chumbo e mercúrio em seis bacias hidrográficas do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. 2003. 144p.
- TORRE, S.D.L.; LOPEZ-REVOL, J. Ecological balance in Mendoza Province threatened by widespread use of copper sulfate, lethal to amphibia. **Vet. Argentina**, v.8, n.78, p.564-566, 1991.
- TUCKER, C.S.; BOYD, C.E. Consequences of periodic applications of copper sulfate and simazine for phytoplankton control in catfish ponds. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v.107, n.2, p.316-320, 1978.
- TURNER, R.J. Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.N.A.. **Vertebrate Blood Cells**. New York, Cambridge University Press, 1988, p.129-209.
- van FURTH, R.; COHN, Z.A.; HIRSCH, J.G.; HUMPHREY, J.H.; SPECTOR, W.G.; LANGEVOORT, H.L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull. World Heal. Org.**, v.46, n.6, p.845-852, 1972.
- VARANKA, Z. **Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio L.*) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid**. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.128C, p.467-478, 2001.
- VEIGA, M.L.; EGAMI, M.I.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (characiformes, Characidae). **Rev. Chil. Anat.**, v.18, n.2, p.245-250, 2000.
- VERRIOPOULOS, G.; DIMAS, S. Combined toxicity of copper, cadmium, zinc, lead, nickel, and chrome to the copepod *Tisbe holothuriae*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.41, p.378-384, 1988.

- WANG, J.H.; CHANG, M.H. Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Coa fisheries**, v.46, p.69-87, 1994.
- WATER RESEARCH CENTER, 1974. **Fishes and water quality criteria**. Notes on Water Pollution, n.65. Stevenage Laboratory.
- WESTFALL, B.A Coagulation Film Anoxia in Fishes. **Ecology**, v.26, p.283-287, 1945.
- WILLIAM, R.W.; WARNER, M.C. Some observations on the stained blood cellular elements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J. Fish Biol.**, v.9, p.491-497, 1976.
- WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Hematol.**, v.51, p.32-49, 1934.
- WONG, C.K.; PAK, A.P. Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc: individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.73, p.190-196, 2004.
- YAMAMOTO, Y.; ISHI, T.; IKEDA, S. *Studies on Koper metabolism in fishes. II. The site of copper accumulation in the tissues of carp.* **Bull. Jap. Scie. Fish.**, v.43, p.1327-1332, 1977.
- ZAGATTO, P.A. **Evaluation ecotoxicologique du reservoir Guarapiranga, SP, Brésil, en relation avec le problème des algues toxiques et des algicides.** *Tese (Doutorado), Centre des Sciences de l'Énvironnement, Université de Metz: 1995. 350p.*
- ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G. *Toxicidade em águas do Estado de São Paulo.* **Ambiente**, v.5, n.1, p.13-20, 1991.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** New Jersey, Prentice Hall, 1996.

**7.1. Solução de Heparina:**

Solução de heparina (5.000 UI).....1,0 ml  
Solução salina 0,7%.....50,0 ml  
Conservar em geladeira.

**7.2. Solução de Hayem:**

Bicloreto de mercúrio.....0,5 g  
Sulfato de sódio.....5,0 g  
Cloroeto de sódio.....1,0 g  
Água destilada.....200,0 ml  
Conservar em geladeira.

**7.3. Solução de Cianometahemoglobina:**

Ferricianeto de potássio.....100,0 mg  
Bicarbonato de sódio.....2,0 mg  
Cianeto de potássio.....50,0 mg  
Água destilada.....1000,0 ml  
Conservar em frasco âmbar, em lugar refrigerado.