

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

EFEITOS TÓXICOS DO COBRE NO CARDINAL TETRA

(*Paracheirodon axelrodi* SCHULTZ, 1956)

Leonardo da Silveira Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais - PPG-BTRN/INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus – AM

2006

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

EFEITOS TÓXICOS DO COBRE NO CARDINAL TETRA

(Paracheirodon axelrodi SCHULTZ, 1956)

Leonardo da Silveira Rodrigues

Orientador: Adalberto Luís Val, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais - PPG-BTRN/INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Financiamento: CNPq

PRONEX (FAPEAM/CNPq)

Projeto Cobre (ICA)/Fundação Djalma Batista

Manaus – AM

2006

Aos meus pais, José Odilon Rodrigues Pereira e Selma
Lúcia da Silveira Pereira;

Aos meus irmãos, Cecília da Silveira Rodrigues e
Marcelo da Silveira Rodrigues;

Aos meus avós, Hélio Rodrigues Pereira e Lizete
Cardoso da Silveira,
eu dedico essa dissertação.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Leonardo da Silveira.

Efeitos Tóxicos do Cobre no Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956) / Leonardo da Silveira Rodrigues – 2006. Manaus, AM, x + 37p.

Dissertação de Mestrado (INPA/UFAM)

1.Cobre 2.Toxicologia 3.Regulação iônica 4.Fisiologia 5.*Paracheirodon axelrodi*

CDD 19.ed. 597.5041

SINOPSE

O presente trabalho analisou os efeitos tóxicos do cobre sobre o fluxo líquido dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , e do fluxo unidirecional de Na^+ em diferentes águas, determinando também a sensibilidade ao cobre de *Paracheirodon axelrodi*, por meio da determinação da concentração média letal em 24, 48, 72 e 96 horas (CL_{50}). Foi verificado que o valor de CL_{50} para o cobre foi baixo em *P. axelrodi*, indicando que esses organismos são sensíveis ao cobre em águas pobres em íons. Foi verificado também aumento nas perdas difusivas de Na^+ , Cl^- e K^+ de *P. axelrodi* expostos ao cobre na água do Rio Negro. Tendo sido percebido que não ocorreu inibição do influxo de Na^+ nas condições experimentais as quais os animais foram expostos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas pessoas e oportunidades colocadas em meu caminho.

Ao Dr. Adalberto Luis Val pela orientação, ensinamentos, oportunidade e confiança depositada em meu trabalho.

Aos meus amigos Rafael Duarte, Alzira Miranda, Ana Cristina e Rubens Honda pelo inestimável auxílio na realização dos experimentos e por todas as discussões teóricas, que enriqueceram meu trabalho, além dos momentos de descontração, que tornaram mais leves as atribuições.

A toda equipe LEEM, pela participação e colaboração nos diversos momentos do curso.

Aos meus grandes amigos, senhores Cesar “Cesário” Haag jaraqui, Daniel “Troll” Toffoli jaraqui e William “Williansom” Vasconcelos jaraqui, pela amizade, papos e idéias e parceria nesses dois anos de muitas novidades e convivência.

A Daniela Mello, Daniel Previattelli e demais colegas de curso do BADPI da turma de 2004 pelos momentos divertidos que juntos tivemos, e pelas amizades construídas.

Às minhas amigas Joana Ruivo e Adília Nogueira pelos gostosos momentos que tivemos juntos ao longo desses anos.

À Carminha, a Elany e a Dra. Ângela Varella por facilitar a vida de todos nós alunos do BADPI.

Aos professores e pesquisadores do INPA por produzir e transmitir conhecimentos valorosos para o enriquecimento do saber.

A Angélica Laredo, Raquel Abecassis e a Nazaré Paula por darem todo o suporte logístico necessário para a realização dos trabalhos no LEEM.

Ao senhor Asher Benzaken (Turky's Aquarium) pela doação dos exemplares de peixes utilizados nos experimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao INPA e a UFAM por toda estrutura e equipe de professores, técnicos e servidores de uma maneira geral.

Aos meus pais, irmãos e avós pela força e presença constantes em minha vida e apoio nas minhas decisões.

A todos os meus amigos e parentes das Minas Gerais que torceram por mim e me acompanharam, mesmo que distantes, nessa etapa da minha vida.

Obrigado.

Toxic Effects of Copper on Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate copper's toxic effects on *Paracheirodon axelrodi* from the Rio Negro basin, to determinate the sensitivity to copper of the adults of this species in waters with low pH levels and low concentrations of dissolved ions, the analysis of Na⁺ unidirectional fluxes and finally, Cl⁻ and K⁺ liquid fluxes, on these organisms. The obtained results show that: 1) this species is relatively sensitive to copper in waters with low concentrations of organic matter and ions. 2) these organisms are resistant to the copper's toxic effects in waters with high concentrations of dissolved ions. 3) they didn't show any inhibition to Na⁺ influx at tested conditions. 4) and that occurred an increase of the diffused losses of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ in organisms exposed to copper in water from Rio Negro.

Efeitos Tóxicos do Cobre no Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do cobre sobre *Paracheirodon axelrodi*, proveniente da sub-bacia do Rio Negro, determinando assim a sensibilidade ao cobre para adultos desta espécie em águas com baixo pH e baixa concentração de íons dissolvidos além de analisar os fluxos unidirecionais de Na^+ e os fluxos líquidos de Cl^- e K^+ nesses organismos. Os resultados obtidos mostram: 1) que o cardinal é uma espécie relativamente sensível ao cobre em águas pobres ionicamente e com pouca matéria orgânica dissolvida. 2) que os cardinais são resistentes aos efeitos do cobre em águas com muitos íons dissolvidos. 3) que eles não apresentaram inibição do influxo de Na^+ nas condições testadas. 4) que ocorreu aumento das perdas difusivas de Na^+ , Cl^- e K^+ nos cardinais expostos ao cobre na água do Rio Negro.

“Viver é muito perigoso. Querer o bem com demais força, de incerto jeito, pode já estar sendo se querendo o mal, por principiar. Esses homens! Todos já puxavam o mundo para si, para o consertar consertado. Mas cada um só vê e entende as coisas dum seu modo.”

(João Guimarães Rosa – Grande Sertão Veredas)

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ambiente Amazônico	1
1.2. Cobre.....	2
1.2.1. Concentração média letal (CL ₅₀)	3
1.2.2. Efeitos sobre a ionoregulação.....	4
1.3. A espécie <i>Paracheirodon axelrodi</i>	5
1.4. Objetivos	6
Geral.....	6
Específicos	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Aquisição dos Animais	7
2.2. Determinação da CL ₅₀ -96horas	7
2.3. Fluxo unidirecional de Na ⁺ e fluxos líquidos de Cl ⁻ e K ⁺	9
2.3.1. Protocolo experimental.....	9
2.3.2. Análises	10
2.4. Análise Estatística.....	11
3. RESULTADOS	13
3.1. Determinação da CL ₅₀ -96horas.....	13
3.2. Ionoregulação	17
3.2.1. Fluxos unidirecionais de Na ⁺	17
3.2.2. Fluxos líquidos de cloreto e potássio	21
4. DISCUSSÃO	26
4.1. Determinação da CL ₅₀ -96horas	26
4.2. Ionoregulação	28
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ambiente Amazônico

A Amazônia, região que apresenta uma área de 7 milhões de km² (Sioli, 1991), possui uma diversidade de habitats compostos por rios, lagos, igarapés, várzeas, igapós, florestas e campos de terra firme. A bacia Amazônica despeja aproximadamente 175.000 m³ de água por segundo no oceano Atlântico, o que representa cerca de 20% de toda a água doce que entra nos oceanos do planeta (Sioli, 1968).

Três tipos básicos de água ocorrem na bacia Amazônica: águas brancas, águas claras e águas pretas (Sioli, 1968). Cada tipo de água tem suas próprias características físicas, químicas e biológicas, além das diferenças nos solos que compõem as bacias de drenagem de cada tipo de água. Ambientes de água preta, tais como o Rio Negro e seus tributários têm por principais características, concentrações iônicas extremamente baixas, elevada acidez e alta concentração de compostos orgânicos (Sioli, 1968). As baixas concentrações de íons nos rios de água preta da Amazônia devem-se à geoquímica de seus solos associados (Sioli, 1968). A cor destas águas é atribuída à elevada concentração de compostos orgânicos, coletivamente conhecidos como substâncias húmicas, resultantes da decomposição de matéria orgânica vegetal e animal. Estes compostos são também responsáveis pela acidez natural atribuída às águas pretas, que no Rio Negro apresentam um pH variando entre 5,0 e 6,0 e nos igapós, florestas inundadas por rios de águas pretas, entre 3,0 e 4,0 (Sioli, 1991; Walker, 1995).

A poluição das águas constitui um dos mais sérios problemas ecológicos da atualidade. As fontes de poluição da água advêm, principalmente, das atividades antrópicas, na forma de resíduos domésticos e industriais, sendo os resíduos industriais os principais responsáveis pela contaminação dos ambientes aquáticos por metais

(Sorensen, 1991; Heath, 1995). Na região Amazônica há graves focos de poluição. Algumas dessas fontes de poluição referem-se a altas concentrações de cátions metálicos diluídos nos corpos d'água. Estes cátions metálicos podem originar-se de rejeitos de atividades industriais como, por exemplo, no igarapé do Quarenta, no igarapé de São Raimundo, nos igarapés do entorno do distrito industrial de Manaus, entre outros (Silva *et al.*, 1995); atividades de garimpo, como por exemplo, no rio Madeira e no rio Tapajós (Kligerman *et al.*, 2001); o desflorestamento na sub-bacia do Tapajós (Artaxo *et al.*, 2000; Roulet *et al.*, 2000), entre outras formas. Dadas suas características, tais como a alta diversidade de habitats e a alta diversidade biológica, a Amazônia apresenta-se vulnerável à ação destes poluentes.

1.2. Cobre

O cobre é considerado um elemento traço essencial para o bom funcionamento do organismo (Sorensen, 1991), participando da defesa contra radicais livres, na neurotransmissão, no metabolismo celular do ferro e compondo enzimas envolvidas na respiração celular, entre outras funções (revisito por Matsuo, 2004). Entretanto, em altas concentrações, este elemento pode ser extremamente tóxico para os seres vivos (Heath, 1995), sendo reconhecido como um dos metais mais tóxicos para os peixes (Lloyd, 1992).

Devido a sua alta toxicidade, o cobre é um dos metais de maior interesse para o estudo do efeito da poluição sobre a fisiologia dos peixes. Este metal está presente na água doce como resultado do desgaste ou erosão do solo, das emissões das estações de esgoto, dos processos industriais e do uso agrícola (Sorensen, 1991). No ambiente aquático o cobre pode ser encontrado em diversas formas: particulado, coloidal,

solubilizado, sendo que suas formas tóxicas incluem CuCO_3 , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$, CuOH^+ e Cu^{+2} , esta considerada a mais tóxica das espécies químicas de cobre (Howarth & Sprague, 1978).

Em geral, a toxicidade do cobre é altamente influenciada por características físicas e químicas da água, como dureza, alcalinidade, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido (Howarth & Sprague, 1978) e, de forma muito relevante, a matéria orgânica dissolvida (MOD) (Matsuo, 2004). Dessa forma, para que uma espécie de peixe seja considerada mais sensível do que outra em relação à toxicidade do cobre, é necessário que sejam levadas em consideração certas características físico-químicas da água.

Os peixes podem acumular o cobre em diversos órgãos e tecidos de forma direta, a partir da água, ou indireta, por meio de alimentos (Seymore *et al.*, 1996). Este acúmulo pode resultar em alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo, sendo que, de uma maneira geral, peixes juvenis são mais sensíveis aos efeitos do cobre do que peixes adultos (Howarth & Sprague, 1978).

O cobre pode afetar o metabolismo dos peixes de diferentes maneiras, sendo também diversas as formas de se analisar os efeitos tóxicos deste metal nos organismos. Alguns efeitos e formas de verificá-los são descritos a seguir.

1.2.1. Concentração média letal (CL₅₀)

Uma forma de se avaliar os efeitos tóxicos do cobre são os testes de toxicidade aguda, sendo que um dos possíveis testes diz respeito à determinação da concentração média letal (CL₅₀). Exposições agudas a altas concentrações de cobre podem causar uma rápida destruição do epitélio branquial, provocando a morte do organismo devido a

hipoxemia, a desequilíbrio iônico ou ao distúrbio ácido-base (Laurén & McDonald, 1987).

Sprague (1990) define CL_{50} como a concentração de uma substância que causa a mortalidade de 50% de um grupo de organismos num determinado tempo de exposição (de 24 a 96 horas). O teste de CL_{50} fornece informações rápidas sobre a toxicidade de um determinado metal em uma dada espécie, e tem sido utilizado de forma intensa na avaliação da qualidade da água e dos impactos ambientais (Goldstein *et al.*, 1983).

1.2.2. Efeitos sobre a ionoregulação

Dentre os diversos tecidos dos peixes, as brânquias constituem o principal órgão alvo da toxicidade do cobre, pois correspondem a uma área funcional de cerca de 50% em relação à superfície corpórea destes animais (Hughes, 1980), e estão em contato direto com o ambiente aquático. Dessa forma, danos branquiais causados pelo cobre podem afetar o funcionamento desse órgão, levando a distúrbios nas trocas gasosas, na regulação iônica e no equilíbrio ácido-base (Laurén & McDonald, 1987).

O cobre atua promovendo alterações dos mecanismos ionoregulatórios por meio de uma rápida diminuição nos eletrólitos plasmáticos, devido à inibição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias, culminando com a inibição do influxo de Na^+ (Laurén & McDonald, 1985). Em concentrações muito elevadas, o cobre também atua na permeabilidade das junções paracelulares, deslocando o íon cálcio, principal íon responsável pelo controle da permeabilidade branquial, favorecendo o efluxo de íons (Laurén & McDonald, 1985). A inibição do influxo dos íons Na^+ e Cl^- branquiais, juntamente com o aumento do efluxo de Na^+ , ocasiona a diminuição desses íons no plasma. Desta forma, a água presente no plasma flui para os tecidos, tornando o sangue altamente concentrado. A alta viscosidade sangüínea provoca falha no sistema

circulatório do peixe, podendo levá-lo à morte (Wilson & Taylor, 1993). Normalmente, os efeitos do metal nas brânquias são dose-dependentes, sendo que os distúrbios fisiológicos e os danos morfológicos no epitélio branquial aumentam com o incremento das concentrações de metal na água (Mazon *et al*, 1999).

Sendo assim, a avaliação dos ajustes fisiológicos no transporte de íons é um importante aspecto na compreensão da sobrevivência dos peixes em um ambiente contaminado com cobre. Esta avaliação pode ser feita por meio da utilização de radioisótopos, que nos permite determinar os mecanismos de transporte de íons e compreender a dinâmica deste processo, por meio de técnicas como as medidas de fluxos unidirecionais (Wood, 1992). Esta técnica possibilita a obtenção de dados sobre as taxas de transporte do íon estudado (influxo, J_{in}), as perdas difusivas (efluxo, J_{out}) e o saldo do processo (fluxo líquido, J_{net}), (Wood, 1992).

1.3. A espécie *Paracheirodon axelrodi*

O cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi*, Schultz 1956) pertence à família Characidae, ordem dos Characiformes. É um animal de pequeno porte, podendo alcançar 3,0 cm de comprimento total. Alimenta-se de vermes e pequenos crustáceos, sendo uma espécie de animal social que tem o hábito de formar cardumes (site: www.fishbase.org). Sua distribuição geográfica são as bacias do Rio Negro e do Rio Orinoco, apresentando estrutura metapopulacional (Harris & Petry, 2001). Possui coloração corporal vermelha com uma faixa azulada que se estende da nadadeira adiposa aos olhos (site: www.fishbase.org), sendo animais apreciados na ornamentação.

O cardinal tetra é a espécie mais importante no mercado de peixes ornamentais na região do Rio Negro, representando cerca de 80% do total de peixes exportados

anualmente do estado do Amazonas e um dos peixes mais populares no mercado internacional (Axelrodi, 2001).

Estes peixes possuem transporte de sódio especializado para operar em águas cujas concentrações iônicas são extremamente baixas. Eles apresentam elevadas taxas de transporte de sódio, associadas a uma também elevada afinidade dos transportadores de Na^+ na membrana branquial (Matsuo, 2004). Além disso, esses animais também são capazes de sustentar elevadas taxas de transporte de Ca^{2+} , o que indica que eles possuem transporte especializado também para o cálcio (Matsuo, 2004).

1.4. Objetivos

Geral

Avaliar o efeito do cobre sobre a espécie de peixe *Paracheirodon axelrodi*, proveniente de águas com baixo pH e alto teor de carbono orgânico dissolvido (Bacia do Rio Negro).

Específicos

- 1) Determinar a sensibilidade de *P. axelrodi* ao cobre em dois tipos diferentes de água.
- 2) Analisar os efeitos da exposição aguda ao cobre sobre os fluxos unidirecionais de Na^+ e os fluxos líquidos de Cl^- e K^+ de *P. axelrodi*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aquisição dos Animais

Os exemplares de cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* foram adquiridos junto à empresa exportadora de peixes ornamentais Turkys aquarium, localizada em Manaus – AM. Os animais foram transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), CPEC/INPA, onde receberam tratamento profilático, por uma semana, com solução salina (5% de NaCl – 50g/L) e foram aclimatados em um tanque de 500 litros, com sistema de aeração constante e filtro biológico. No período de aclimação, os animais receberam alimentação diária com ração comercial pelletizada ou previamente triturada. A alimentação foi interrompida 48 horas antes do início da fase experimental.

2.2. Determinação da CL₅₀-96horas

Após o período de aclimação foram preparados 15 tanques de 3 litros, contendo diferentes concentrações de cobre, sendo que a concentração inicial utilizada foi de 20µgCu (concentração máxima de Cu permitida pela resolução do CONAMA, n.º 020 de 18 de junho de 1986, para águas de classe tipo 1)* e as demais concentrações foram escolhidas aleatoriamente. Foi utilizado um sistema contínuo de renovação da solução teste e aeração constante. Para cada um desses tanques foram transferidos 10 animais, pesando em média 0,257±0,08g, mantendo-se sempre a proporção de 0,8 gramas de biomassa por litro da solução teste utilizada. A solução teste utilizada nos experimentos foi obtida por meio da dissolução de alíquotas determinadas de uma

* Em 17 de março de 2005 o CONAMA lançou uma nova resolução (nº 357) sobre classificação de águas, que não foi levada em consideração neste estudo, pois os experimentos já haviam sido iniciados quando ela foi editada.

solução molar de cloreto de cobre di-hidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na água mole padrão da EPA (Agência de proteção ambiental norte-americana) que apresenta a seguinte composição química: $[\text{Na}^+]$ 3,27; $[\text{K}^+]$ 1,05; $[\text{Ca}^{2+}]$ 6,98; $[\text{Mg}^{2+}]$ 6,05; $[\text{Cl}^-]$ 1,0 mg/l; dureza igual a 67,4 mg CaCO_3 /l e pH igual a $4,64 \pm 0,3$ (pH reduzido com utilização de ácido sulfúrico). Porém, devido aos resultados obtidos nos experimentos com essa água, ela deixou de ser utilizada nos demais testes.

Após o experimento com a água mole padrão da EPA, novos testes de exposição aguda foram realizados, também com dez animais pesando em média $0,239 \pm 0,05$ g, por tanque, que possuíam as mesmas características dos utilizados no experimento anterior. Desta vez, porém, foram utilizados 10 tanques e a água em que foram realizados os testes foi a do poço do INPA, que apresenta as seguintes características: $[\text{Na}^+]$ 0,83; $[\text{K}^+]$ 0,45; $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,16; $[\text{Mg}^{2+}]$ 0,036; $[\text{Cl}^-]$ 0,90 mg/l; dureza igual a 6,15 mg CaCO_3 /l e pH igual a 6,5.

A cada 12 horas foram retiradas amostras de água de cada um dos tanques experimentais para monitoramento do pH e determinação das concentrações de cobre dissolvido nas soluções testes por meio de espectrofotometria de absorção atômica (*Perkin Elmer Analyst 800*). As mortalidades dos cardinais observadas em cada tanque nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram utilizadas para estimar a concentração letal de cobre (CL_{50}) para cada tempo de exposição, por meio do programa computacional *Spearman-Karber* (Hamilton *et al.*, 1977), levando-se em consideração as concentrações de cobre dissolvidas na água de cada um dos tanques.

Ao final desta etapa, toda a água utilizada no experimento foi transferida para um reservatório de 500 litros, onde foi adicionado carbonato de cálcio (CaCO_3), para a formação de carbonato de cobre (CuCO_3), que precipitou, sendo a água sobrenadante descartada por diluição e o material precipitado armazenado para posterior eliminação

em depósito próprio para resíduos sólidos tóxicos. O mesmo procedimento foi adotado ao final das demais etapas.

2.3. Fluxo unidirecional de Na⁺ e fluxos líquidos de Cl⁻ e K⁺

Para a determinação do efeito do cobre sobre os fluxos corporais de Na⁺ e do balanço entre as trocas de K⁺ e Cl⁻ nos cardinais tetra foram utilizadas concentrações de cobre dissolvido representando 0,5, 1 e 1,5 do valor estimado da CL₅₀-96 horas. Nestes experimentos analisou-se o efeito do cobre nas três diferentes concentrações e em dois tipos de água (água do poço do INPA e água de um igarapé da bacia do Rio Negro) sobre o transporte de Na⁺ e sobre o fluxo líquido de Cl⁻ e K⁺ no *Paracheirodon axelrodi*. A água do igarapé da bacia Rio Negro apresentou as seguintes características no momento da coleta: [Na⁺] 0,016; [K⁺] 0,008; [Ca²⁺] 0,005; [Mg²⁺] 0,005; [Cl⁻] 0,048 mg/l e pH entre 6,0 e 6,5. A água do poço do INPA apresentou as mesmas características descritas no item 2.2.

Os fluxos unidirecionais de Na⁺ foram avaliados a partir do desaparecimento do radioisótopo ²²Na (Amershan Pharmacia) da água das câmaras experimentais ao longo do tempo (Wood, 1992). Os fluxos líquidos dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ foram determinados pelas variações nas concentrações destes íons nas câmaras experimentais ao longo do tempo.

2.3.1. Protocolo experimental

Os animais (n=9), com peso médio de 0,218 ± 0,07g, foram transferidos individualmente para câmaras experimentais de polietileno com 15 ml de H₂O. Inicialmente os peixes foram mantidos nas câmaras por 3 horas para aclimação,

sendo, após este período, transferidos para novas câmaras experimentais com as soluções teste para cada tratamento. As soluções teste utilizadas foram preparadas como descrito na secção 2.2, obtendo-se as concentrações de cobre equivalentes a 0, 0,5, 1 e 1,5 do valor estimado da CL₅₀-96 horas (0, 22, 45 e 67 µgCu/l, respectivamente), com o acréscimo do radioisótopo ²²Na (2,7 µl do estoque de 5 nCi/µl de ²²Na por câmara).

No início do experimento uma amostra de 5 ml de água foi coletada (T₀) de cada uma das câmaras e transferida para frascos apropriados, sendo coletadas novas amostras de 5 ml após o fim de cada experimento (1, 2 e 3 horas) para a determinação das concentrações de ²²Na⁺, Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em cada câmara experimental.

2.3.2. Análises

A determinação da radioatividade da amostra e a medida de fluxo correspondente foram calculadas a partir dos valores de cpm (contagens por minuto) das amostras de ²²Na, analisadas com auxílio de um cintilador (*Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman & Coulter*). Alíquotas de 500 µL de cada uma das amostras de água foram transferidas para frascos de cintilação aos quais foi adicionado 1 mL de coquetel de cintilação (NBCS – Amersham Pharmacia) que foram, a seguir, lidas no cintilador por 5 minutos cada uma.

A determinação das concentrações de Na⁺ e K⁺ nas amostras foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica (*AAAnalyst 800 – Perkin Elmer*), utilizando-se mistura de ar com acetileno como combustível. Já as concentrações de Cl⁻ foram determinadas utilizando-se o método colorimétrico descrito por Zall *et al.* (1956).

Os valores da contagem de ^{22}Na e da concentração de Na^+ , foram utilizados para calcular o influxo, efluxo e fluxo líquido, representados respectivamente por J_{in} , J_{out} e J_{net} por meio das equações abaixo:

$$J_{\text{net}} = ([\text{íon}_1] - [\text{íon}_2]).V / W.t,$$

$$J_{\text{in}} = ([R_1] - [R_2]).V / 0.5 .W.t.SA,$$

$$J_{\text{out}} = J_{\text{net}} - J_{\text{in}}$$

Onde: íon_1 e íon_2 são as concentrações inicial e final, respectivamente, do íon na água (μM);

V é o volume de água na câmara experimental (L);

W é o peso do peixe (g);

R_1 e R_2 são as contagens por minuto do radioisótopo na câmara no início e no final do intervalo de tempo, respectivamente (cpm);

SA é a atividade específica do isótopo (cpm/mL), sendo determinada pela relação:

$$SA = ([R_1] / [\text{íon}_1]) + ([R_2] / [\text{íon}_2])$$

Já os valores de concentração de K^+ e Cl^- foram utilizados para calcular o fluxo líquido (J_{net}) por meio da equação: $J_{\text{net}} = ([\text{íon}_1] - [\text{íon}_2]).V / W.t$, apresentada acima.

2.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média e erro padrão da média (SEM). Para o cálculo da CL_{50} foi aplicado o programa computacional “*LC₅₀ Programs JS Pear Test*” baseado no método *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton *et al.*, 1977). Os resultados dos parâmetros de fluxo iônico verificados nos peixes sob exposição às concentrações subletais do cobre foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA). Quando ocorreu diferença significativa entre os tratamentos em

nível de 5%, foi aplicado o teste de *Dunnet* para a discriminação das diferenças entre os tratamentos e o controle (Zar, 1984).

3. RESULTADOS

3.1. Determinação da CL₅₀-96horas

Esse experimento foi, inicialmente, realizado com a água mole padrão da EPA. Porém, com essa água não foi possível encontrar um valor de CL₅₀, pois em nenhuma das 15 concentrações utilizadas foi observada mortalidade de 100% dos animais, mesmo com a exposição dos organismos a 2600 µgCu/l. Na realidade a máxima mortalidade verificada foi de 40% após 96 horas de exposição (Figura 1).

Para a determinação da CL₅₀ de cobre com a água do poço do INPA, que possui características aproximadas às da água do Rio Negro quanto aos principais íons, os exemplares de *Paracheirodon axelrodi* foram expostos a 31,5; 46,8; 63,4; 66,7; 73,5; 75,8; 117,6; 650,0; 655,7 e 816,8 µgCu/l por 96 horas, tendo sido analisadas as mortalidades em cada tanque teste. Desta forma, as CL₅₀ 24, 48, 72 e 96 horas encontradas foram: 103,09 (com limite inferior de 65,22 e limite superior de 165,81); 75,66 (52,43; 109,19); 69,65 (47,55; 102,03) e 45,87 (39,14; 53,75) µgCu/l respectivamente. Esses valores apresentam tendência de queda, demonstrando que para menores tempos de exposição é necessário que haja uma quantidade maior de cobre para causar mortalidade de 50% dos indivíduos (Figura 2).

Os valores obtidos para a CL₅₀-96 horas do cobre na água do poço do INPA, citados acima, foram utilizados como referência para a realização dos experimentos de ionoregulação (Figura 3).

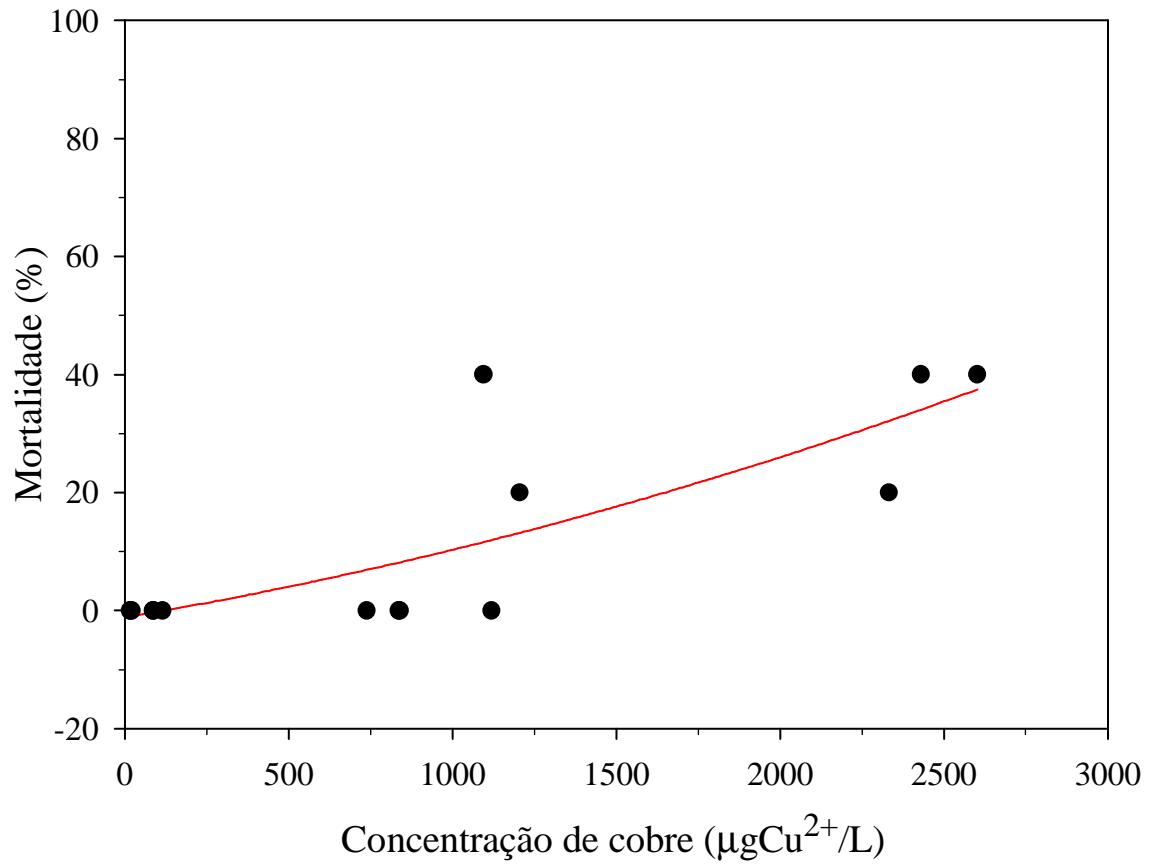


Figura 1. Mortalidade (%) de *Paracheirodon axelrodi* (n = 15) após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de cobre na água mole padrão da EPA.

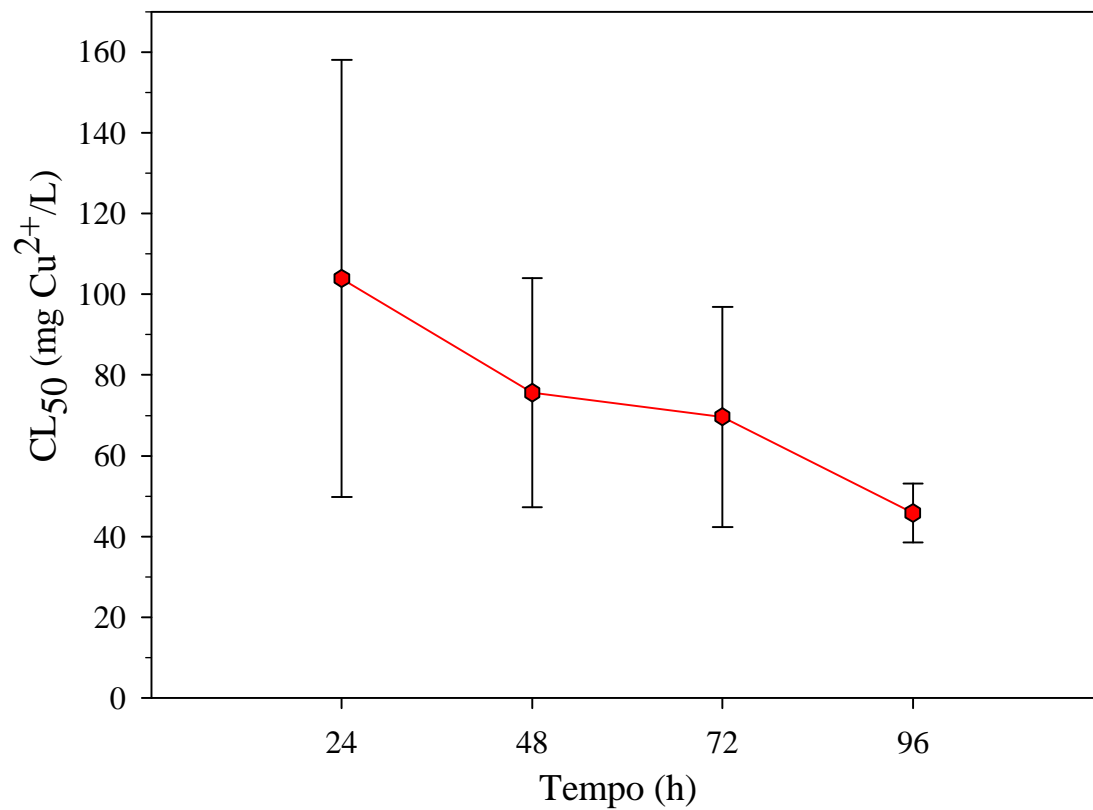


Figura 2. CL₅₀ cobre para a espécie *Paracheirodon axelrodi* em 24, 48, 72, 96 horas de exposição e seus respectivos intervalos de confiança (95% superior e inferior) na água do poço do INPA.

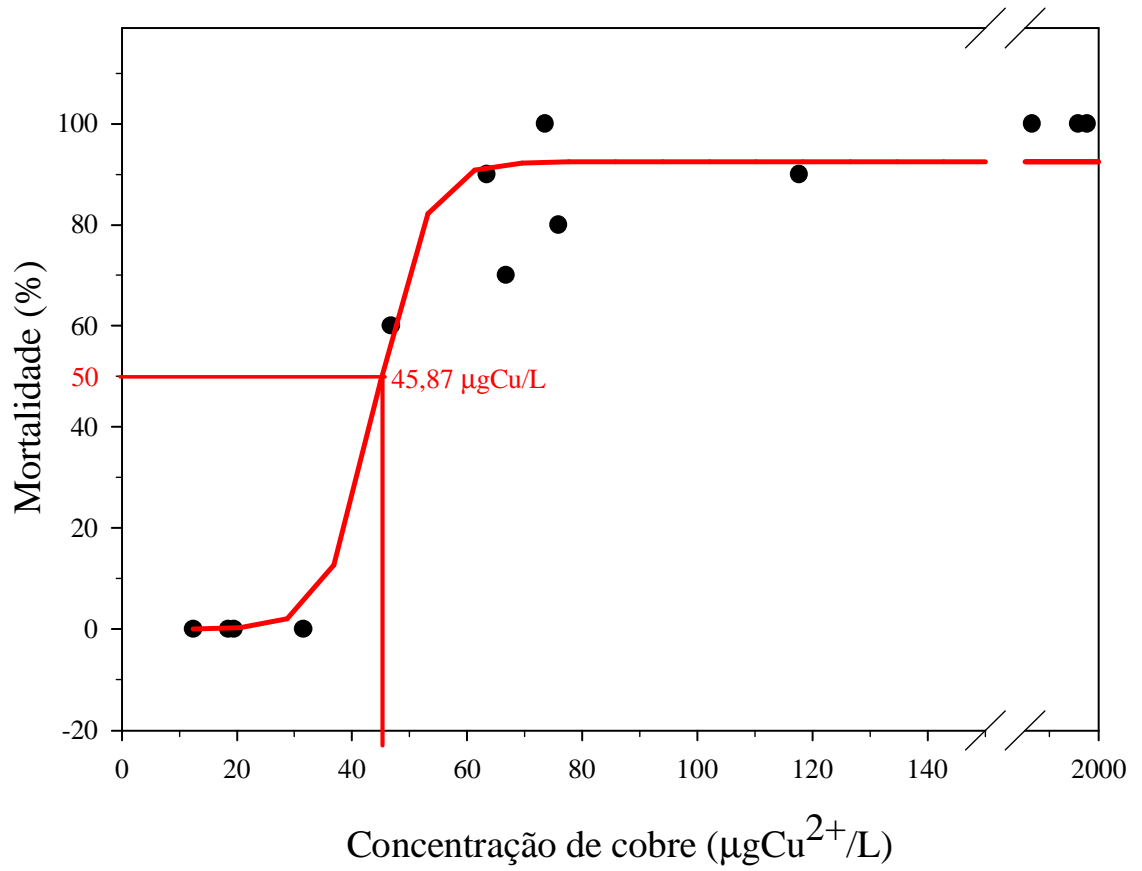


Figura 3. CL₅₀-96 horas de cobre para a espécie *Paracheirodon axelrodi*, com água do poço do INPA.

3.2. Ionoregulação

3.2.1. Fluxos unidirecionais de Na⁺

Esse experimento foi realizado em dois tipos de água (água do poço do INPA e água de um igarapé da bacia do Rio Negro) e foi baseado no valor de CL₅₀-96 horas de cobre encontrado para o cardinal tetra na água do poço do INPA. Os animais foram expostos a 4 tratamentos: tratamento controle (CTL), tratamento com exposição a metade do valor da CL₅₀-96 horas ($\frac{1}{2}$ CL₅₀), tratamento com exposição ao valor da CL₅₀-96 horas (CL₅₀) e tratamento com exposição uma vez e meia o valor da CL₅₀-96 horas ($1\frac{1}{2}$ CL₅₀). Os valores de cobre dissolvido observados em cada um dos tratamentos, aos quais os peixes foram expostos, na água do poço do INPA foram 7,73±0,92, 30,13±0,63, 45,40±6,41, e 68,47±7,04 µgCu/L, respectivamente, e na água de um igarapé da bacia do Rio Negro foram 5,70±2,60, 22,73±2,37, 47,67±3,93, e 69,47±0,23 µgCu/L, respectivamente.

A análise dos fluxos unidirecionais de Na⁺ nos cardinais expostos ao cobre na água do poço mostrou que o influxo do íon não apresenta alterações significativas ao longo do tempo nos diferentes tratamentos. Entre os tratamentos e o controle, há estímulo do influxo de Na⁺ apenas no experimento de 2 horas no tratamento com $1\frac{1}{2}$ CL₅₀ (com um aumento de tomada de sódio aproximado de 105%). O efluxo do Na⁺ também mostrou pouca alteração ao longo do tempo, apresentando perdas difusivas (aproximadamente 62%) apenas no tratamento com $1\frac{1}{2}$ CL₅₀ após 2 horas de exposição, da mesma forma que no influxo. Já o fluxo líquido não apresentou alterações significativas (Figura 4).

No experimento de exposição ao cobre na água do igarapé, os resultados encontrados apresentaram diferenças em relação ao experimento com a água do poço.

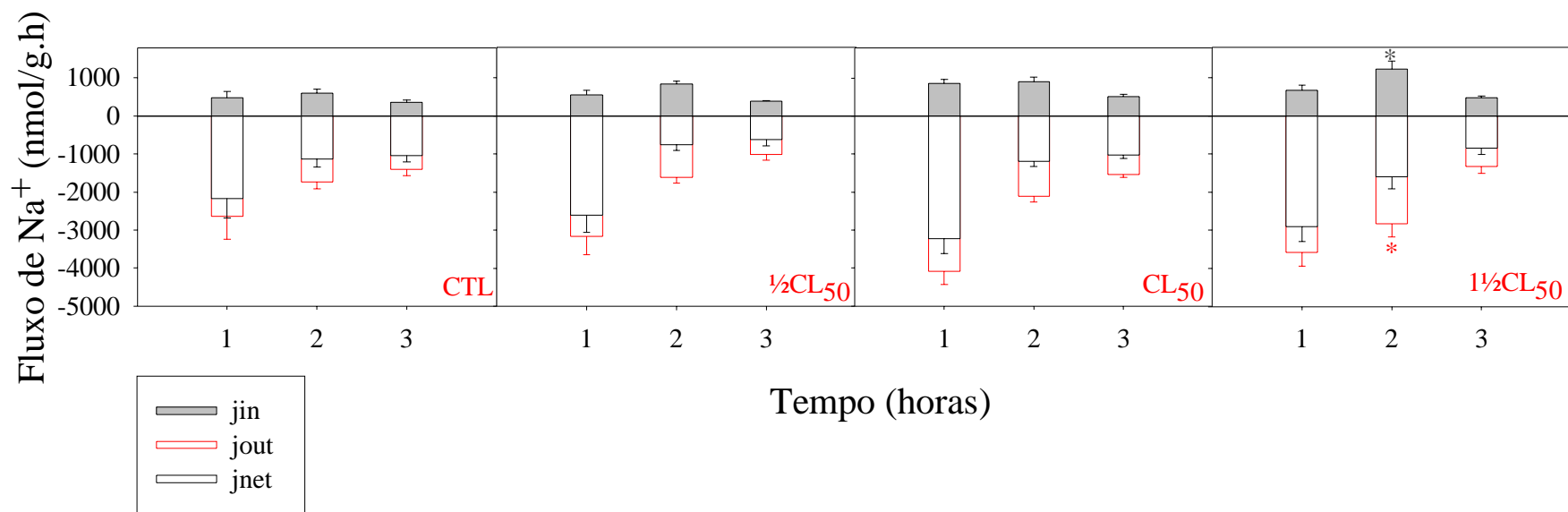


Figura 4. Efeitos do Cu sobre os fluxos de Na⁺ em *Paracheirodon axelrodi* na água do poço do INPA. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o influxo dos tratamentos e o controle; * representa diferença estatística (p<0,05) entre o efluxo dos tratamentos e o controle.

Nesse experimento, foram observadas variações no influxo do íon Na^+ entre os tratamentos, tendo sido verificados aumentos nas taxas de tomada desse íon, com diferenças estatísticas nos tratamentos com $\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ e $1\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ após 1 hora e no tratamento com $1\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ após 2 horas. Em relação ao efluxo, ocorreram diferenças estatísticas em todos os tratamentos no experimento de 3 horas mostrando um aumento nas perdas difusivas. O fluxo líquido do controle demonstrou uma tendência de queda entre os diferentes tempos, aproximando-se de 0 no experimento de 3 horas. Foi verificada diferença estatística no fluxo líquido de Na^+ em todos os tratamentos do experimento de 3 horas indicando um aumento de perdas difusivas neste período de exposição (Figura 5).

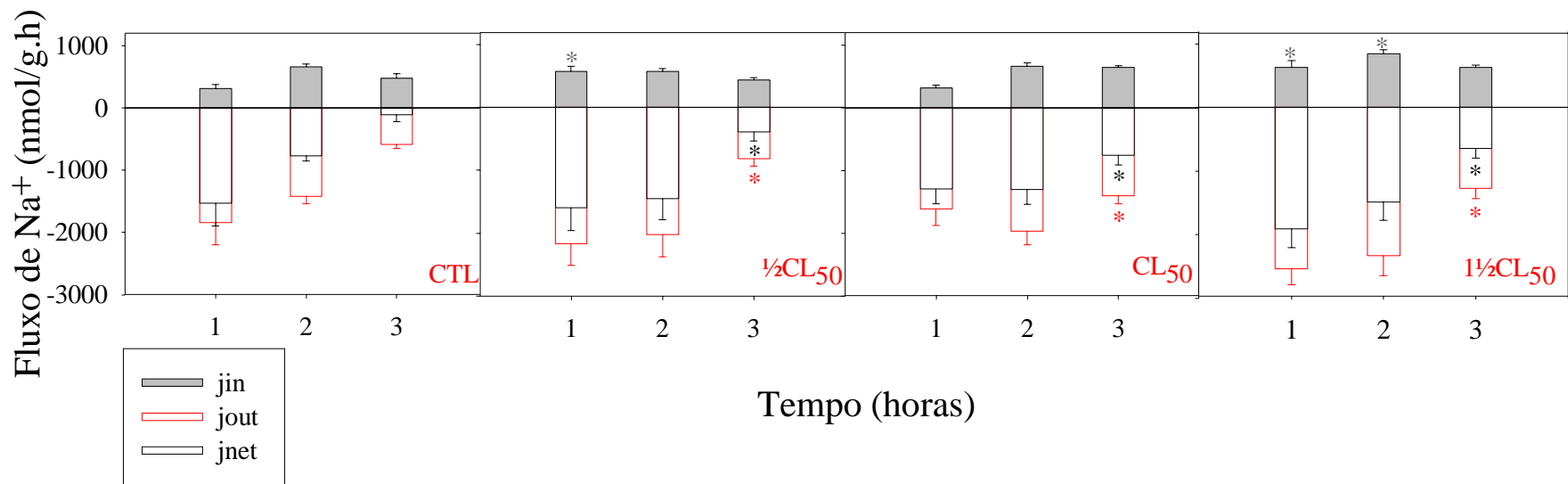


Figura 5. Efeitos do Cu sobre os fluxos de Na⁺ em *Paracheirodon axelrodi* na água do igarapé. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o influxo dos tratamentos e o controle; * representa diferença estatística (p<0,05) entre o efluxo dos tratamentos e o controle; * representa diferença estatística (p<0,05) entre o fluxo líquido dos tratamentos e o controle.

3.2.2. Fluxos líquidos de cloreto e potássio

Em relação aos fluxos líquidos de cloreto no experimento com água do poço ocorreu diferença estatística em todos os tratamentos após 2 horas, sendo verificada uma diminuição nas perdas líquidas em relação ao controle nesse período de exposição (Figura 6). No experimento com água do igarapé, ocorreu diferença estatística nos tratamentos de CL_{50} e $1\frac{1}{2}CL_{50}$ após 3 horas. Nesse período houve uma aumento nas perdas líquidas de cloreto nos tratamentos citados (Figura 7).

No experimento com água do poço as taxas líquidas de fluxo de K^+ foram relativamente constantes (próximas de 1000 nmol/g/hora). Não foram verificadas diferenças estatísticas em nenhum dos tratamentos (Figura 8). No experimento com água do igarapé as taxas de fluxo líquido de K^+ também variaram apenas discretamente ao longo do tempo, tendo sido encontradas, no entanto, diferenças estatísticas nos tratamentos com $\frac{1}{2}CL_{50}$ e CL_{50} após 2 horas (Figura 9).

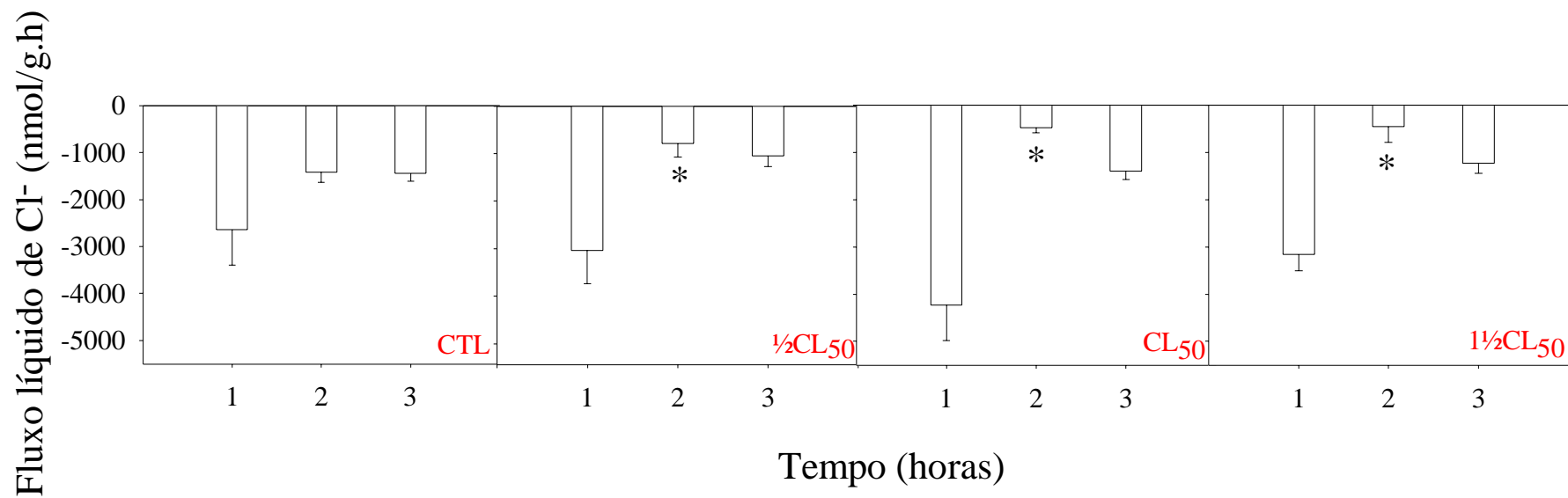


Figura 6. Efeitos do Cu sobre o fluxo líquido de Cl⁻ em *Paracheiroidon axelrodi* na água do poço do INPA. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o fluxo líquido dos tratamentos e o controle.

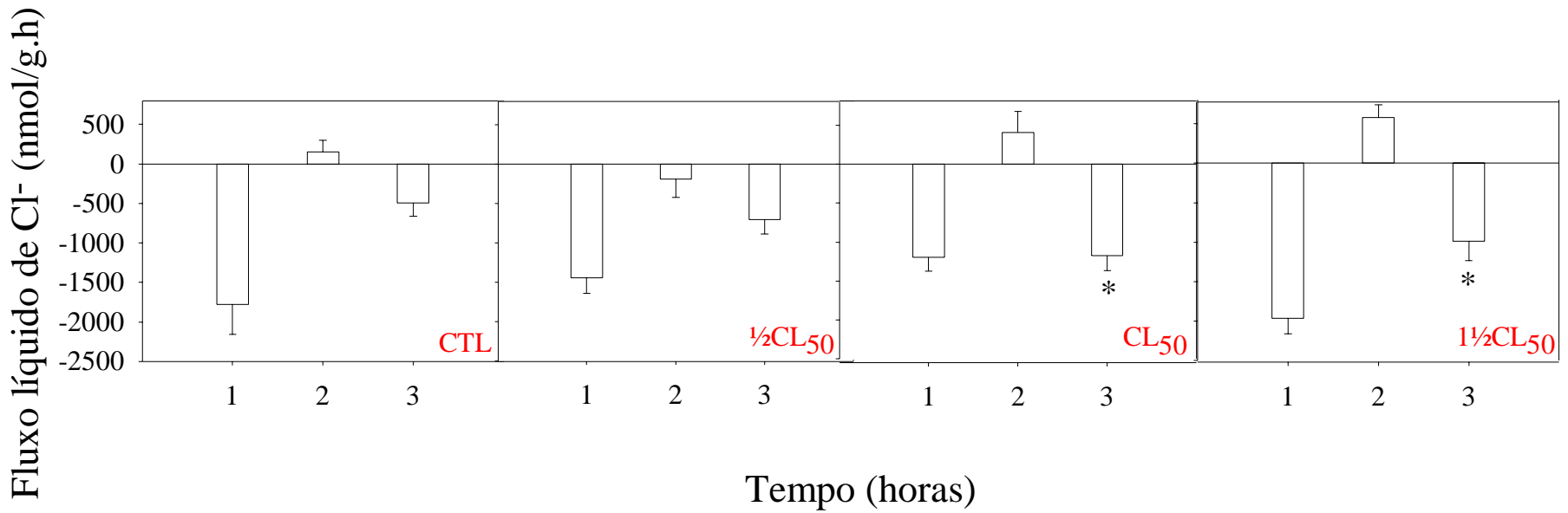


Figura 7. Efeitos do Cu sobre o fluxo líquido de Cl⁻ em *Paracheirodon axelrodi* na água do igarapé. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o fluxo líquido dos tratamentos e o controle.

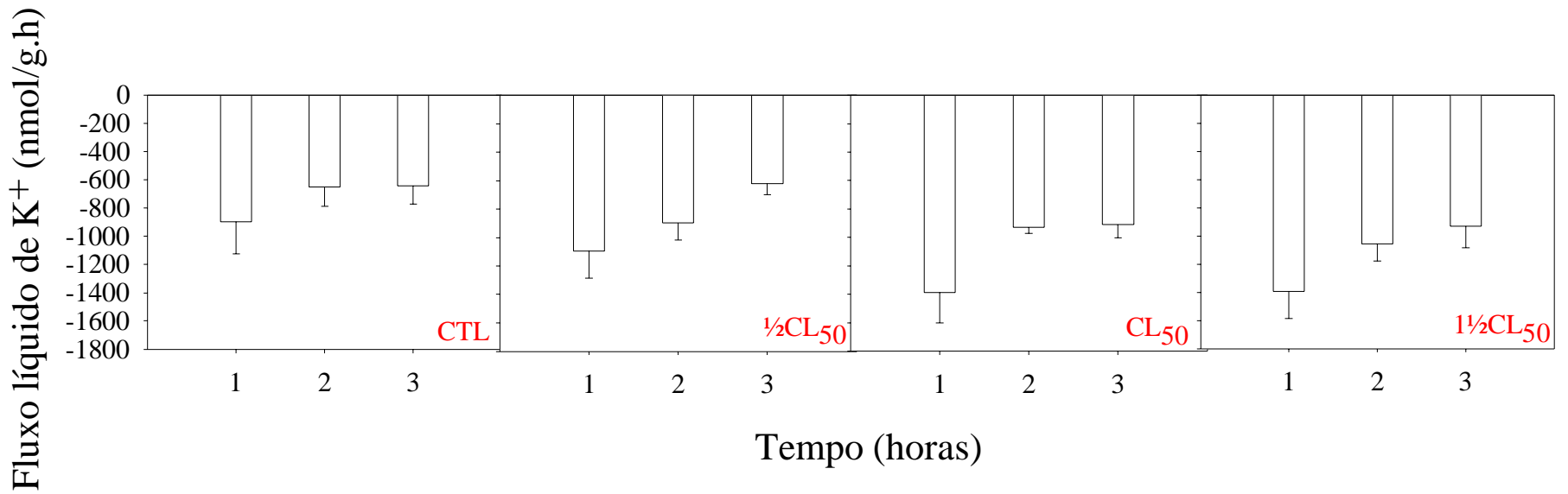


Figura 8. Efeitos do Cu sobre o fluxo líquido de K⁺ em *Paracheirodon axelrodi* na água do poço do INPA. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o fluxo líquido dos tratamentos e o controle.

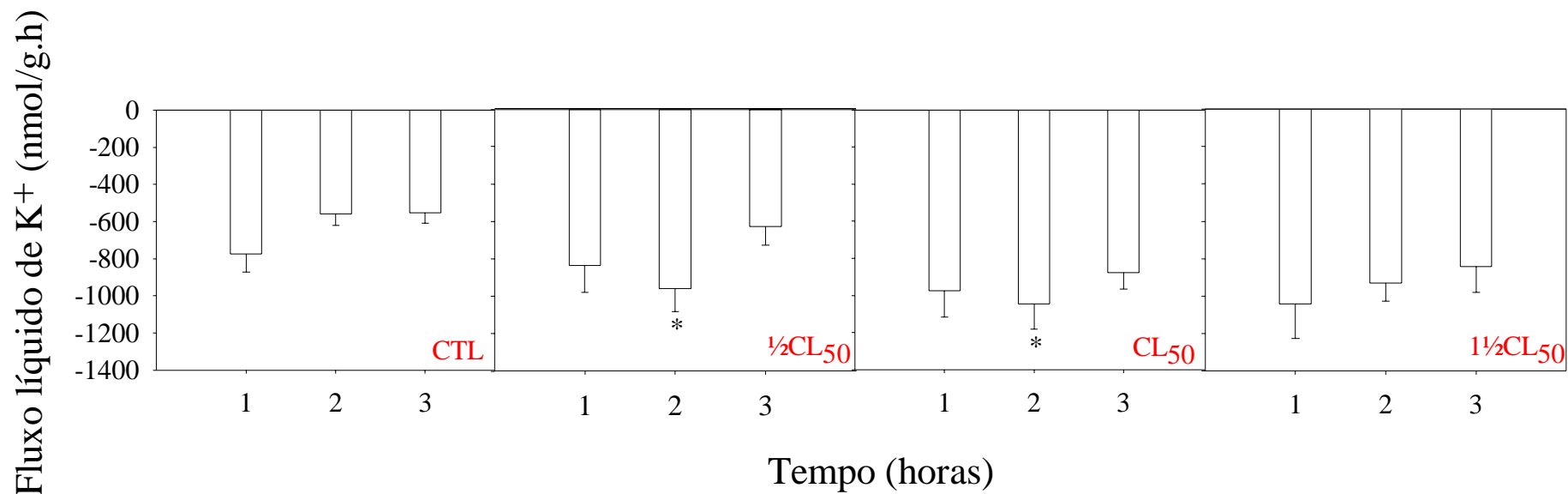


Figura 9. Efeitos do Cu sobre o fluxo líquido de K⁺ em *Paracheirodon axelrodi* na água do igarapé. CTL=controle; 1/2-CL₅₀ – 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas; CL₅₀ – concentração letal 50, 96 horas; 1 1/2 CL₅₀ - 1 1/2 vezes a concentração letal 50 em 96 horas. * representa diferença estatística (p<0,05) entre o fluxo líquido dos tratamentos e o controle.

4. DISCUSSÃO

4.1. Determinação da CL₅₀-96horas

Os efeitos tóxicos da exposição aguda ao cobre têm sido estudados em várias espécies de peixes ao redor do mundo. Estes estudos, entretanto, são em sua maioria realizados com espécies de clima temperado tais como *Cyprinus carpio* (Karan *et al.*, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Marr *et al.*, 1998), *Sparus sarba* (Wong *et al.*, 1999), *Carassius auratus*, *Lebistes reticulatus*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* (Pickering & Handerson, 1966), entre outras. Foram realizados, também, alguns estudos com espécies neotropicais, como por exemplo: *Hyphessobrycon callistus* (Damato, 1997), *Colossoma macropomum* (Menezes, 2005), *Hyphessobrycon scofoli* e *Corydoras sp.* (Duarte *et al.*, 2005). Deve-se levar em consideração que a resistência ao cobre, relativamente maior, verificada nas espécies temperadas pode estar relacionada com o tipo de água desses ambientes. Sendo assim foi utilizado a água mole da EPA nesse experimento para fins comparativos.

No presente estudo, não foi possível encontrar um valor de CL₅₀ para o cardinal, quando exposto ao cobre na água mole da EPA. Possivelmente, isso ocorre devido à grande quantidade de íons dissolvidos nesta água em relação à água do Rio Negro, de onde a espécie de peixe aqui estudada provém. Como as águas do Rio Negro são extremamente pobres em íons dissolvidos, os peixes que nela habitam apresentam respostas evolutivas às suas condições. O cardinal, por exemplo, apresenta uma elevada afinidade de ligação ao Ca²⁺, mesmo em condições de extrema acidez (Matsuo, 2004). Na água mole padrão da EPA, a quantidade de Ca²⁺ dissolvida é aproximadamente 43 vezes maior que a quantidade desse mesmo íon dissolvido na água do poço do INPA. Como o cálcio é um íon que compete com o cobre no sítio de ligação nas brânquias dos

peixes (Laurén & McDonald, 1985; Playle *et al.*, 1992) e controla a permeabilidade da membrana e as funções ionoregulatórias (Hunn, 1985), os cardinais apresentaram-se bastante protegidos contra os efeitos danosos do cobre, quando expostos a esse contaminante na água mole padrão da EPA.

Na água do poço do INPA, os valores de CL₅₀ apresentaram-se mais elevados nos menores tempos de exposição do que nos maiores, indicando o aumento da sensibilidade do organismo ao efeito tóxico do cobre, com o passar do tempo de exposição. Isto é esperado, pois, para que haja mortalidade de 50% da população de um tanque em um tempo menor é necessário que uma maior quantidade de contaminante seja colocada em contato com o organismo. Exposições agudas a contaminantes ambientais, como o cobre, promovem, geralmente, distúrbios fisiológicos devido às altas concentrações em que são expostos os organismos teste. Dessa forma, o aumento da sensibilidade dos exemplares de *P. axelrodi* associado ao aumento do tempo de exposição provavelmente deve estar relacionado aos danos físicos do cobre na estrutura e no funcionamento das brânquias, interferindo nos processos homeostáticos dos organismos.

Para *Colossoma macropomum*, espécie que ocorre em toda a bacia amazônica, Menezes (2005) encontrou um valor de CL_{50-96h} de 2680 µgCu/l em água mole com pH 4,0. *Hyphessobrycon callistus*, espécie oriunda da bacia do rio Negro, apresentou um valor de CL_{50-96h} de 28 µgCu/l em água mole com pH de 7,8 (Damato, 1997). Já *Hyphessobrycon scofoli* e *Corydoras* sp., ambas espécies da bacia do Rio Negro, apresentaram valores de CL_{50-96h} na água do poço do INPA de 26,85 µgCu/l e 63,16 µgCu/l, respectivamente (Duarte, *et al.*, 2005). *Paracheiroidon axelrodi*, neste trabalho, apresentou um valor de CL_{50-96h} de 45,87 µgCu/l em água mole (dureza = 6,15) e pH de 6,5. Estes estudos sugerem que as espécies do rio Negro (rio de águas pretas) são

mais sensíveis ao cobre que as provenientes de outras bacias, apesar de que no caso do experimento com o *C. macropomum*, os animais utilizados apresentavam um porte maior do que os cardinais. Possivelmente isso ocorre devido ao fato de que quando o cobre é dissolvido nestes ambientes ele torna-se biodisponível, tendo menos moléculas complexadas ou adsorvidas, principalmente por causa do baixo pH do Rio Negro e por ele ser pobre em íons dissolvidos. O pH, particularmente, interfere na toxicidade do cobre pelo fato de que em ambientes ácidos a espécie Cu^{2+} (mais reativa) é a forma predominante.

Os dados obtidos mostram que o cardinal é uma espécie relativamente sensível ao cobre em águas pobres ionicamente e com pouca matéria orgânica dissolvida (MOD). Estes dados agora devem ser confrontados com os valores de CL_{50} a serem obtidos com a água do rio Negro a fim de melhor entender o papel da MOD sobre a biodisponibilidade do cobre nos ambientes aquáticos desta bacia. Deverá ser avaliado, também, o seu papel na sensibilidade dos organismos da rica ictiofauna encontrada nestes locais, sendo que na presença de uma maior quantidade de MOD, espera-se que os valores de CL_{50} para o cobre sejam superiores, uma vez que a MOD tem a capacidade de formar complexos com cátions metálicos (Pagenkopf, 1983), tornando-os menos disponíveis para se ligar nas brânquias dos peixes.

4.2. Ionoregulação

As medidas de fluxo unidirecional de Na^+ no cardinal na água do poço do INPA revelaram uma relativa tolerância da espécie aos efeitos tóxicos do cobre, nas concentrações testadas. Houve um aumento no influxo e no efluxo de sódio no tratamento com a concentração equivalente a $1\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ após 2 horas, sem que ocorresse aumento nas perdas líquidas. Como os mecanismos de toxicidade do cobre são

semelhantes aos da toxicidade do pH no transporte de Na^+ (Laurén & McDonald, 1985; Lloyd, 1992; Heath, 1995), e essa é uma espécie proveniente de águas ácidas, que apresenta mecanismos adaptativos aos efeitos do baixo pH, esse pequeno efeito do cobre encontra-se de acordo com o esperado para a espécie.

Não houve inibição no transporte de Na^+ em nenhum dos tratamentos do experimento com água do poço, apesar de esse ser um dos principais efeitos tóxicos do cobre no epitélio branquial (Laurén & McDonald, 1985; Mazon *et al.*, 1999). Isso pode ter ocorrido devido às concentrações de cobre utilizadas nos testes e ao tempo de exposição dos peixes às mesmas. Por outro lado, não houve um aumento no fluxo líquido de Na^+ , o que demonstra que o cardinal foi capaz de conter o aumento das perdas difusivas ao longo do tempo.

Com relação ao cloreto, houve uma diminuição na perda líquida desse íon após duas horas em todos os tratamentos expostos ao Cu^{2+} e à água do poço, mas nos demais tempos não ocorreram diferenças nas taxas difusivas. Isso sugere que os animais foram capazes de evitar um aumento nas perdas líquidas desse íon mesmo estando expostos a diferentes concentrações de cobre. Já as perdas difusivas de K^+ apresentaram-se relativamente constantes ao longo do tempo, indicando que os mecanismos fisiológicos de regulação do potássio não foram afetados pelos efeitos do cobre.

Nos testes realizados com água do igarapé, entretanto, ocorreram variações nas taxas de transporte de íons dos cardinais. Houve aumento nas taxas de influxo de Na^+ nos tratamentos com exposição a concentrações equivalentes a $1/2\text{CL}_{50}$ e $1 1/2\text{CL}_{50}$ após 1 hora e no tratamento com $1 1/2\text{CL}_{50}$ após 2 horas. Além disso, ocorreu aumento no efluxo e nas perdas líquidas de sódio em todos os tratamentos após 3 horas. O aumento do efluxo difusivo observado nos animais submetidos a condições de estresse ocorre principalmente devido a modificações na permeabilidade da membrana branquial,

provavelmente associadas ao deslocamento dos íons Ca^{2+} das junções paracelulares (McDonald, 1983), causando alterações na integridade do epitélio. O cobre tem a característica de competir pelos sítios de Ca^{2+} na membrana branquial interferindo na conformação do epitélio branquial (Laurén & McDonald, 1985; McDonald *et al.*, 1991; Wood, 1992; Wilson & Taylor, 1993; Mazon *et al.*, 1999). O aumento desse efluxo indica que possivelmente ocorreram danos nas junções paracelulares o que causou o incremento nas perdas difusivas, já que o cobre causa espaçamento e separação dessas junções devido à remoção do Ca^{2+} das mesmas (Wood, 1992). Somado a esse fato, ocorreram também perdas difusivas de Cl^- nos tratamentos com concentrações equivalentes a CL_{50} e $1\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ em 3 horas, além de um aumento de perdas líquidas de K^+ nos tratamentos com $\frac{1}{2}\text{CL}_{50}$ e CL_{50} em 2 horas. Assim como para o fluxo de Na^+ , o balanço ionoregulatório dos íons K^+ e Cl^- dos animais submetidos a situações estressantes está fortemente relacionado com a ação do agente estressor sobre a integridade do epitélio branquial (Wilkie & Wood, 1994; Portela *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999; Mazon *et al.*, 1999; Matsuo & Val, 2002). Como a maior rota difusiva de Na^+ , Cl^- e K^+ são os canais e junções paracelulares (McDonald *et al.*, 1991a; Wood, 1992), e como o cobre tem a capacidade de causar danos nessas junções (Laurén & McDonald, 1985; McDonald *et al.*, 1991a; Wood, 1992; Wilson & Taylor, 1993; Mazon *et al.*, 1999), provavelmente essas perdas se deveram ao efeito da toxicidade do cobre nas brânquias.

Como os aumentos nas taxas difusivas de sódio, cloreto e potássio foram mais significativos na água do igarapé em relação à água do poço do INPA, é possível que isso tenha ocorrido devido à menor quantidade de íons dissolvidos na água do igarapé da Bacia do Rio Negro.

Os efeitos verificados nestes experimentos podem ter ocorrido devido ao fato de que as concentrações utilizadas nos mesmos são referentes a testes de mortalidade de 96 horas, e os períodos aqui analisados foram as três primeiras horas. A escolha no tempo de exposição se deu pelo fato de que os danos na ionoregulação são verificados de uma maneira mais evidente nas primeiras horas de exposição. Outra questão que deve ser lembrada é que a morte nos animais se dá também pelos efeitos do agente tóxico ao longo do tempo. Esses efeitos são cumulativos, sendo que o que ocorreu nas horas iniciais vai ter relevância no estado do animal após períodos mais longos de exposição.

5. CONCLUSÕES

- Os cardinais apresentaram-se muito resistentes aos efeitos danosos do cobre quando expostos a este contaminante em águas com alta concentração de íons, particularmente Ca^{2+} , em comparação a exposições realizadas em águas com baixa concentração de íons.
- Os cardinais são sensíveis ao cobre em águas pobres em íons dissolvidos, como a água do poço do INPA e a água da bacia do Rio Negro.
- Os cardinais não apresentaram inibição do influxo de Na^+ nas concentrações de cobre aos quais eles foram expostos, nas primeiras três horas de exposição.
- Ocorre um aumento nas perdas difusivas de Na^+ , Cl^- e K^+ dos cardinais quando eles são expostos ao cobre na água do Rio Negro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Artaxo, P.; Campos, R.C.; Fernandes, E.T.; Martins, J.V.; Xiao, Z.; Lindqvist, O.; Fernández-Jiménez, M.T. & Maenhaut, W. 2000. Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon basin. *Atmospheric Environment*, 34, 4085-4096.
- Axelrodi, H. R. 2001. Discovery of the Cardinal Tetra and Beyond. *In*: Chao, N. L.; Prang, G.; Sonneschien, L. & Tlustý, M. (Eds.), *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil – Projeto Piaba*. Editora da Universidade do Amazonas. Manaus. pp. 17-25.
- CONAMA, 1986. Resolução n. 020 de 18/06/1986. Conselho Nacional de Meio Ambiente.
- Damato, M. 1997. Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinarias de petróleo na sua toxicidade, empregando diferentes espécies indicadoras. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 335p.
- Duarte, R. M.; Menezes, A.C.; Rodrigues, L.S.; Laredo, M.A. & Val, A.D. 2005. Biological effects of copper on fish of the Amazon. *Quarterly Report of Activities for ICA*.
- Goldstein, E.G.; Zagatto, P.A.; Araújo, R.P.A. & Bertoletti, E. 1983. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de E.R.Q. – Suzano, através de ensaios biológicos. *Revista Dae* 132, 42-47.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7): 714-719.
- Harris, P. & Petry, P. 2001. Preliminary Report on the Genetic Population Structure and Phylogeography of Cardinal Tetra (*Paracheirodon axelrodi*) in the Rio Negro

- Basin. In: Chao, N. L.; Prang, G.; Sonneschien, L. & Tlustý, M. (Eds.), *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil – Projeto Piaba*. Editora da Universidade do Amazonas. Manaus. pp. 17-25.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, FL. 245p.
- Howarth, R.S.; Sprague, J.B. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Research*, 12: 455-462.
- Hughes, G.M. 1980. Functional morphology of fish gills. In. *Epithelial transport in the lower vertebrates* (Lahlou, B. ed), pp 15-36. London: Cambridge University press.
- Hunn, J.B. 1985. Role of calcium on gill function in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 82A, 543-547.
- Karan, V.; Vitorovic, S.; Tutundzic, V.; Poleksic, V. 1998. Functional enzymes activity and gill histopathology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, 40:49-55.
- Kligerman, D.C.; La Rovere, E.L. & Costa, M.A. 2001. Management challenges on small-scale gold mining activities in Brazil. *Environmental Research*, section A 87: 181-198.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology B*, 155: 635-644.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: physiology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 99-104.
- Lloyd, R. 1992. *Pollution and freshwater fish*. The Buckland Foundation, Oxford. 176p.

- Marr, J.C.A.; Hansen, J.A.; Meyer, J.S.; Cacula, D.; Podrabsky, T.; Lipton, J.; Bergman, H.L. 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicology* 43:225-238.
- Matsuo, A.Y.O. & Val, A.L. 2002. Low pH and calcium effects on net Na⁺ and K⁺ fluxes in two catfish species from the Amazon River (*Corydoras*: Callichthyidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:361-367.
- Matsuo, A.Y.O. 2004. Aspectos ecofisiológicos e ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase na regulação iônica. Tese de doutorado, INPA/UFAM, Manaus, AM, 204p.
- Mazon, A.F.; Cerqueira, C.C.C.; Monteiro, E.A.S.; Fernandes, M.N. 1999. Acute copper exposure in freshwater fish: Morphological and physiological effects. In: Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of Tropical Fishes*. Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus. pp. 263-275.
- McDonald, D.G. 1983. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. *Canadian Journal of Zoology*, 61: 691-703.
- McDonald, D.G; Freda, J.; Cavdek, V.; Gonzalez, R.; Zia, S. 1991. Interspecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low pH environments. *Physiological Zoology*, 64: 124-144.
- Menezes, A.L. 2005. Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8. Dissertação de mestrado, INPA/UFAM, Manaus, AM, 71p.
- Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science & Technology*, 17: 342-347.

- Pickering, Q.H.; Henderson, C. 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. *Air and Water Pollution*, 10:453-463.
- Playle, R.C.; Gensemer, R.W.; Dixon, D.G. 1992. Copper accumulation on gills of fathed minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11: 381-391.
- Portela, J.M., Aride, P.H.R., Val, A.L., 1997. Effects of water pH and calcium on ion fluxes of tambaqui (*Colossoma macropomum*). International Symposium Biology of Tropical Fishes, p. 190.
- Roulet, M.; Lucotte, M.; Canuel, R.; Farella, N.; Courcelles, M.; Guimarães, J.R.D.; Mergler, D. & Amorim, M. 2000. Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. *Chemical Geology*, 165, 243-266.
- Seymore, T.; Du Preez, H.H.; Van Vuren, J.H.J. 1996. Bioaccumulation of chromium and nickel in the tissues of *Barbus marequensis* from the Lower Olifants River, Mpumalanga. *South African Journal of Zoology*., 31(3): 101 –109.
- Sioli, H. 1968. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana* 1: 267-277.
- Sioli, H. 1991. *Amazônia. Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes, Petrópolis.
- Sorensen, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. Boca Raton, CRC, 374p.
- Sprague, J.B. 1990. Aquatic Toxicology. In: Schrech, C.B.; Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. p. 491-528.
- Walker, I. 1995. Amazon streams and small rivers. In: Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T.; Bicudo, C.E. (Eds.) *Limnology of Brazil*, p. 176-193.

- Wilkie, M.P., Wood, C.M., 1994. The effects of extremely alkaline water (pH 9,5) on rainbow trout gill function and morphology. *Journal of Fish Biology* 45: 87-98.
- Wilson, R.W.; Taylor, E.W. 1993. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. *Journal of Comparative Physiology B*, 163: 38-47. 0
- Wilson, R.W.; Wood, C.M.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Bergman, H.L.; Narahara, A.; Val, A.L. 1999. Ion and acid-base balance in three species of Amazonian fish during gradual acidification of extremely soft water. *Physiological and Biochemical Zoology* 72:277-285.
- Wong, P.P.K.; Chu, L.M.; Wong, C.K. 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environmental International* 25(4):417-422
- Wood, C.M.; 1992. Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 22: 239-264.
- Zall, D.M., Fisher, D., Garner, M.Q., 1956. Photometric determination of chloride in water. *Analytical Chemistry* 28: 1665-1668.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. 2ed.Pretice-Hall, New Jersey. 718p.