

Ariel Ferreira do Amaral Neto

RESISTÊNCIA DO PEIXE *Mimagoniates*
microlepis (Ostariophysi- Characidae-
Glandulocaudinae) AO CHUMBO
INORGÂNICO (Pb⁺⁺) DISSOLVIDO EM ÁGUA

Monografia apresentada para a
obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas pelo
Departamento de Biologia Celular
do Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná
Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto
de Oliveira Ribeiro

Curitiba
2000

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	iv
1.Introdução.....	1
1.1 Caracterização do contaminante.....	2
1.2 Caracterização da espécie utilizada.....	3
2.Objetivos.....	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3.Material e Métodos.....	7
3.1 Análise de disponibilidade de Pb ⁺⁺ em água reconstituída.....	7
3.2 Coleta e quarentena dos peixes para análise de resistência ao Pb ⁺⁺ dissolvido na água.....	8
3.3 Bioensaios.....	9
4.Resultados.....	12
4.1 Resultados das análise de disponibilidade do Pb ⁺⁺ em água reconstituída.....	12
4.2 Resultados do teste de resistência do peixe <i>Mimagoniates microlepis</i> ao Pb ⁺⁺ dissolvido na água.....	14
5.Discussão.....	18
6.Conclusão.....	20
7.Bibliografia.....	21
8.Anexos.....	23
8.1 Íctio (<i>Ichthyophthirius multifilis</i>).....	23
8.2 Doenças bacterianas.....	24

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ciro A, de O. Ribeiro pela oportunidade de estágio e pela orientação

Aos professores Marco A. F. Randi e Luis Fernando (Zão) Fávaro pela ajuda nos momentos críticos

Ao Nino pela paciência na pesagem dos materiais

Ao João (Melão) pela “co-orientação” neste trabalho

Ao professor Marcelo Aranha pela ajuda na caracterização da espécie

Ao Sérgio pela amizade pelas conversas e pelo incentivo neste trabalho

A todos meus amigos de verdade (Faraco, Celina, Ju Cini, Tetê e Ingo; os mais próximos) pela amizade

A Julia pela paciência, pelo que ela é, ao que passamos e ainda vamos passar

Aos meus Pais pelo apoio, incentivo e confiança nestes anos de vida

Ao meu avô Ariel pelo exemplo

As pessoas que me fizeram errar, ato fundamental para quem crescer

As pessoas que esqueci de agradecer e que de alguma maneira me ajudaram

RESUMO

O chumbo é o quinto metal mais utilizado pela indústria e o terceiro mais tóxico. Seus efeitos agudos em organismos aquáticos ainda não são completamente compreendidos bem como sua dinâmica em condições experimentais. Apesar dos testes de toxicidade terem sido amplamente utilizados nos últimos quarenta anos, poucos foram os estudos realizados utilizando espécies tropicais ou neotropicais brasileiras. *Mimagoniates microlepis* é uma espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o norte do Espírito Santo até o norte do Rio Grande do Sul. Sua distribuição, associada a sua fácil manutenção em cativeiro, tornam esta espécie como adequada a realização de bioensaios. Este trabalho teve como objetivos analisar a disponibilidade do chumbo inorgânico (Pb^{++}) em água reconstituída, iniciar o estudo com espécies nativas, com o intuito de fornecer dados toxicológicos referentes a esta espécie, testar a resistência de *M. microlepis* ao Pb^{++} dissolvido na água e determinar a LC-50 do Pb^{++} para *M. microlepis*. O experimento foi realizado em três etapas. Análise de disponibilidade do Pb^{++} em água reconstituída em 96 horas; onde foram utilizados três aquários com diferentes concentrações (50, 100, e $150\mu g Pb^{++}/l$), coletadas alíquotas 0, 1, 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a adição do Pb^{++} na água para análise em espectrofotômetro de absorção atômica. Duas etapas de testes de resistência de *M. microlepis* ao Pb^{++} dissolvido em água reconstituída em 96 horas foram realizadas, verificando as condições gerais dos indivíduos e eventuais mortos através de observações realizadas 0, 3, 6, 24, 48, 72, e 96 horas após a adição do contaminante. Nos teste de resistência foram utilizados 20 aquários com dez peixes em cada um deles. As concentrações adicionadas foram 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 e $12800\mu g Pb^{++}/l$ em cada dois aquários (réplicas), além dos aquários controle. Após a realização do experimento, foi observado que em 96 horas a concentração de chumbo não reduz a ponto de ser necessário a adição de Pb^{++} durante os testes de resistência. Além disso, a LC-50 do Pb^{++} para *M. microlepis* encontra-se entre 3200 e $12800\mu g/l$ e *M. microlepis* não representa um bom modelo biológico para testes de toxicidade com Pb^{++} devido à sua alta resistência.

ABSTRACT

Lead is the fifth most used metal in the industry, and the third most toxic. Its effects and behavior on aquatic organisms is not completely understood. In spite of the toxic tests had been used in the last forty years, few experiments have used neotropical species. *Mimagoniates microlepis* it is a wide range specie occurring since North of Espirito Santo State until the North of Rio Grande do Sul State. The distribution associate with easy handily in captivity means *M. microlepis* as a good specie to use in bioassays. The objective of this work were: analyze the dynamic of Pb^{++} into aquarium in experimental conditions, introduce the study of toxicology to neotropical freshwater fishes, to study the resistance of *M. microlepis* to Pb^{++} dissolved in water and to find the LC-50 of Pb^{++} dissolved in water to *M. microlepis*. The experiment was mounted in three steps. Analysis of disponibility of Pb^{++} in artificial water during 96 hours. This analysis used three different aquaria with different concentrations of Pb^{++} (50, 100 e 150 $\mu g Pb^{++}/l$). The water sampling (100ml) was at 0, 1, 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 hours after contamination. The next two steps, was to investigate the resistance of *M. microlepis* to Pb^{++} in 96 hours of exposition. The general conditions of fishes including dead ones, was observed 0, 3, 6, 24, 48, 72 e 96 hours after water Pb^{++} contamination. These tests were composed of 20 aquariums with 10 fishes each. The concentrations studied were 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 e 12800 $\mu g Pb^{++}/l$ in two aquariums (replicas). We observed that the Pb^{++} concentration do not decrease during the experiment at 50 and 100 $\mu g Pb^{++}/l$. The LC-50 of Pb^{++} to *M. microlepis* is between 3200 e 12800 $\mu g Pb^{++}/l$ and *M. microlepis* is not a good biological model to toxicity tests with Pb^{++} due its high resistance to this heavy metal.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Exemplar adulto de <i>Mimagoniates microlepis</i>	5
Figura 2. Variação da concentração do Pb ⁺⁺ (50 µg/l) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.....	13
Figura 3. Variação da concentração do Pb ⁺⁺ (100 µg/l) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.....	13
Figura 4. Variação da concentração do Pb ⁺⁺ (150 µg/l) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.....	14
Figura 5. Número de indivíduos mortos após as 96 horas de exposição às diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb ⁺⁺) dissolvido em água reconstituída.....	17
Figura 6. Número de indivíduos sobreviventes durante as 96 horas de exposição ao chumbo inorgânico Pb ⁺⁺ dissolvido em água reconstituída.....	18

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela I. concentração do chumbo dissolvido na água (µgPb ⁺⁺) nos três diferentes aquários testes durante as 96 horas do experimento.....	12
Tabela II. Variação nas condições gerais dos indivíduos expostos a diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb ⁺⁺) dissolvido em água reconstituída após 96 horas de exposição	15
Tabela III. Número total de indivíduos mortos após as 96 horas do experimento nas diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb ⁺⁺) dissolvido em água reconstituída.....	15
Tabela IV. Mortalidade de <i>Mimagoniates microlepis</i> em 96 horas de exposição às concentrações letais de chumbo inorgânico (Pb ⁺⁺) dissolvido em água reconstituída.....	16

1- INTRODUÇÃO

A contaminação dos vários ambientes através da interferência antrópica, resulta em conseqüências muitas vezes irreversíveis para os biomas que habitam estes ambientes. As descargas de esgoto doméstico e industrial, além da mineração, são as principais fontes de contaminação dos ambientes aquáticos em geral. Para combater este problema é necessário o conhecimento das causas e efeitos dos poluentes.

Os testes de toxicidade apresentaram grandes avanços técnicos nos últimos quarenta anos, quando aumentou significativamente o interesse da comunidade científica e dos governantes pelos efeitos causados por estes diferentes poluentes liberados nos ecossistemas naturais. Neste mesmo período houve a padronização de espécies e o desenvolvimento de vários testes padrões adotados mundialmente, com o objetivo de viabilizar eventuais comparações entre os diferentes poluentes, nos testes e nos próprios ecossistemas (Jeffries & Mills, 1994).

Normalmente estes testes apresentam uma aplicabilidade prática limitada porém, as informações obtidas pelos mesmos são de grande importância para entender a dinâmica do poluente e seus efeitos no organismo teste. Um exemplo disto é a concentração considerada segura para um determinado poluente, a qual é considerado ao equivalente a 10% da concentração letal onde morrem 50% dos indivíduos contaminados (LC-50) em 48 ou 96 horas.

Há um grande número de testes de toxicidade adaptados a organismos e ecossistemas específicos. Com relação a quantificação dos efeitos dos agentes tóxicos, os testes podem ser classificados basicamente em dois tipos: testes de toxicidade crônica e toxicidade aguda.

Teste de toxicidade crônica são aqueles que tem como resultados efeitos sub-letais ou letais em um período mais longo de tempo. Os efeitos sub-letais mais comumente analisados são variações na capacidade reprodutiva e taxas de crescimento. Teste de toxicidade aguda é aquela que resulta na morte do indivíduo em um espaço relativamente curto de tempo (para vertebrados este tempo varia entre 24 e 48 horas). Dentre os testes de toxicidade crônica o mais comumente empregado é o teste de concentração letal a 50% (LC-50),

que é a concentração onde 50% do indivíduos testados morrem em um período de tempo pré-determinado (48 ou 96 horas). A relação entre o valor logarítmico da concentração e o valor logarítmico do período médio de sobrevivência do organismo testado é curvilíneo e a concentração existente onde a curva se torna assintótica (tangente) com o eixo do tempo é o valor conhecido como LC-50 (Oga, 1996; Food and Agriculture Organization of United Nations, 1983).

1.1 Caracterização do contaminante

Pertencente ao grupo IV B da tabela periódica, o chumbo é um metal de cor prateada ou cinza-azulada, dúctil, maleável, alterável pela umidade do ar e resistente à corrosão. Seu peso atômico é 207,2 densidade específica 11,35 a 20° C, ponto de fusão 327,5° C e ponto de ebulição 1740° C. Possui compostos importantíssimos de amplo uso industrial como os óxidos, acetato, hidróxido, carbonato, nitrato, sulfato, sulfeto (galena natural) sais duplos entre outros. Com relação a solubilidade poucos são solúveis em água, porém a maioria é dissolvida pelos ácidos. Nos fluidos orgânicos a maioria dos compostos inorgânicos é solúvel.

O principal minério de chumbo é a galena (PbS), porém uma importante fonte de obtenção é a recuperação de sucatas de metal. Em quinto lugar no ranking dos metais mais produzidos pela indústria, atrás do ferro, cobre, alumínio e zinco, o chumbo tem grande parte de sua produção total utilizada na fabricação de baterias. As demais principais utilidades são a gasolina plumbica, projéteis, tintas, vidros cerâmicos, além da indústria e da mineração de uma maneira geral.

Alguns compostos de chumbo são absorvidos através da pele, como os sais e ácidos de chumbo, chumbo metálico e nitrato de chumbo; os compostos orgânicos são absorvidos pela pele por serem lipossolúveis. No sangue o chumbo se liga aos eritrócitos na proporção de 95%. São três os compartimentos principais para o chumbo no corpo. O primeiro é o sangue e alguns órgãos parenquimáticos onde o chumbo apresenta uma meia vida de cerca de 35 dias. O segundo compartimento são os tecidos moles de uma maneira geral com meia vida de 40 dias, e o terceiro é representado pelo tecido ósseo com meia vida de cerca de 20 anos em humanos. Mais de 90% do

chumbo corpóreo se concentra nos ossos além destes são observadas altas concentrações no fígado, nos rins, adrenal, tireóide e jejuno. Cerca de 76% do chumbo absorvido é excretado da urina, 16% pelo trato gastrointestinal e 8% por outras vias, sendo todos os dados observados em humanos (Oga,1976).

O efeito bioquímico mais comum causado pelo chumbo é a inibição da síntese do complexo heme. O chumbo interfere com a conversão do ácido delta aminolevulínico impedindo que a hemoglobina venha a se formar, levando a anemia do indivíduo (Oga,1976).

O chumbo tem a capacidade de ligar-se a sulfidril e outros sítios ativos em muitos sistemas enzimáticos, levando à inativação destas enzimas. A síntese do grupamento heme é sensível ao envenenamento por chumbo (tendo 2 enzimas inibidas) gerando um estado anêmico ao indivíduo. Este metal provoca também efeitos tóxicos para o sistema nervoso podendo gerar efeitos deletérios (Broody,1997).

São vários os fatores que influem na toxicidade do chumbo como: espécie, idade, estado do sistema gastrointestinal, presença de enfermidades (estado geral do indivíduo), vias de entrada, níveis de ingestão, exposição anterior, estado físico do contaminante e presença de outros poluentes. Além disso o chumbo é excretado lentamente pelo organismo podendo ter efeito cumulativo no sistema nervoso em formação (Larini,1997; Manahan,1992; Hodson et al.,1984, Pelletier,1995; Vighi, 1981).

1.2 - Caracterização da espécie utilizada

O *Mimagoniates microlepis* (Figura 1) é um peixe de atividade diurna. Os indivíduos desta espécie podem ser observados em locais rasos de correnteza fraca a moderada, próximos à superfície e um pouco distantes às margens. A noite permanecem em repouso próximos ao leito do rio.

Em ambiente natural *M. microlepis* é uma espécie predominantemente insetívora. Segundo Sabino e Castro (1990), os itens alóctones representam cerca de 74% de sua alimentação enquanto os autóctones 26%. Aproximadamente 63% da dieta é composta de insetos terrestres, 26% de insetos aquáticos e 10% de aracnídeos. A tática alimentar predominante é a cata na superfície sendo também observado a cata de itens arrastados pela corrente (Sabino e Castro,1990)

O *M. microlepis* é a espécie de distribuição mais ampla da tribo Glandulocaudini. Esta espécie ocorre desde o norte do Rio Grande do Sul até o norte do Espírito Santo em águas claras e rápidas de pequenos córregos e áreas marginais de rios maiores, sendo encontrado sempre próximo a áreas de vegetação palustre em relativa abundância.

A espécie em questão é exceção ao padrão geral de distribuição (norte-sul) do gênero. Existe uma população nas cabeceiras do rio Iguaçu a oeste da Serra do Mar. Não existe nenhuma diferença morfológica aparente nesta população existindo duas hipóteses para ocorrência da espécie nesta região. A primeira é um fenômeno conhecido como captura de cabeceira onde devido a algum evento ambiental ocorre o contato entre as duas cabeceiras. Este evento é perfeitamente viável para este caso pois existe uma grande proximidade de algumas nascentes das duas bacias na região da Serra do Mar. A Segunda seria por introdução antrópica sendo esta menos aceita pela época em que este evento deveria ter ocorrido, associada a suposta falta de interesse para com esta espécie (Weitzman et. al, 1988)

Existem três padrões distintos de coloração em *Mimagoniates microlepis* relacionados a um isolamento geográfico destas populações o que poderia supor serem estágios iniciais de especiação. A primeira ocorre mais ao norte a partir de Angra dos Reis até o limite norte e apresenta uma coloração azul escuro brilhante. De Ubatuba até Itanhaém ocorre uma segunda população tendo como característica um padrão de cor azul claro e marrom escuro. A população mais ao sul coletada a partir de Morretes apresenta um padrão semelhante ao da população ao norte sendo o azul um pouco mais pálido (Weitzman,1988).



Figura 1. Exemplar adulto de *Mimagoniates microlepis* (foto de Piednoir C.)

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- ✦ Iniciar o estudo de espécies nativas com o objetivo de fornecer dados de toxicologia referentes a espécies neotropicais

2.2 - Objetivos específicos

- ✦ Avaliar o comportamento do chumbo em água reconstituída dentro do período experimental de 96h.
- ✦ Testar a resistência de *Mimagoniates microlepis* às diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água
- ✦ Detectar a LC-50 do chumbo para *Mimagoniates microlepis*
- ✦ Verificar eventuais alterações morfológicas nas hemácias de *Mimagoniates microlepis* resultante da exposição ao chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido na água.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi composto montado em três etapas sucessivas nas quais foram determinados a biomassa do chumbo em água reconstituída, e os testes para determinação da resistência de *Mimagoniates microlepis* ao chumbo inorgânico Pb^{++} dissolvido em água.

Em todas as etapas foi utilizada água reconstituída obedecendo as seguintes concentrações: 0,0065g/l $CaCl_2$; 0,1335g/l $MgSO_4$; 0,0004g/l KCl ; 0,0105g/l $NaHCO_3$, diluídos em H_2O destilada e deionizada (CETESB, 1991). A condutividade variou entre 160 e 180 $\mu S/cm$, o pH 7,0 a 7,4, a dureza entre 65 a 75 $mgCaCO_3/l$, e a temperatura entre 22 e 24 °C. (ABNT, 1993 a,b,c)

Todo o material utilizado durante o experimento (vidraria, aquário e acessórios) foi previamente lavado em solução de HNO_3 a 5% em H_2O destilada e deionizada para assegurar a ausência de qualquer traço de chumbo contaminando o mesmo.

3.1-Análises de disponibilidade do Pb^{++} em água reconstituída

Este teste tem por objetivo quantificar a presença do chumbo (Pb^{++}) em água reconstituída após diferentes diluições por um período de 96 horas. Através desta análise é possível determinar a dinâmica do chumbo (Pb^{++}) no aquário, obedecendo as mesmas condições experimentais que seriam utilizadas em estudo para determinar a resistência de *Mimagoniates microlepis* a este metal.

Para este estudo foram utilizadas três diferentes concentrações (50, 100 e 150 $\mu g Pb^{++}/l$). Para se chegar a estas concentrações foram observados os seguintes procedimentos:

Foi preparada uma solução estoque diluindo em 100ml de água destilada e deionizada, 0,5g de nitrato de chumbo $Pb(NO_3)_2$. Com isso obteve-se uma solução de 0,3126g de chumbo (Pb^{++}) dissolvidos em 100ml, levando-se em consideração o peso molecular do $Pb(NO_3)_2$ de 331g e o peso atômico do Pb de 207g. para obtenção das concentrações desejadas nos três aquários teste, de 50, 100 e 150 microgramas de chumbo por litro, foram adicionados

respectivamente 160, 320 e 450 microlitros da solução estoque em 10 litros de água reconstituída contida em cada um dos aquários-teste. Além da análise dos três aquários teste acima descritos foi também analisada a água de um aquário controle sem qualquer adição de chumbo, constituindo assim o “branco”, para corroborar a ausência do metal no mesmo.

Cada amostragem foi composta de três alíquotas (uma por aquário teste), incluindo uma alíquota do aquário sem a adição do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ na primeira amostragem (branco), somando trinta e quatro alíquotas no total. As amostragens foram realizadas em 0, 1, 4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a adição do chumbo na água.

Todas as amostras foram acondicionadas em frascos de poliuretano, previamente lavados (como descrito anteriormente) sendo que para cada 100 ml de amostra foi adicionado 0,5ml de ácido nítrico (Merck Co.) com o objetivo de disponibilizar o Pb^{++} na água. A única amostra sem a adição de chumbo (controle) teve 500ml de volume e foi adicionado 2,5ml de ácido nítrico. Após a coleta as amostras foram enviadas ao LAC, (Laboratório de Análises da Copel) onde foram analisados através do espectrofotômetro de absorção atômica, onde foi determinada a concentração de chumbo (Pb^{++}) em $\mu\text{g/l}$.

3.2 - Coleta e quarentena dos peixes para análise de resistência ao chumbo (Pb^{++}) dissolvido em água

Os peixes utilizados foram coletados, com o auxílio de rede do tipo puçá, em um córrego (de nome desconhecido), na interseção da rodovia BR-277 com uma via de acesso ao município de Piraquara, (próximo a fábrica da Renault). Foram coletados aproximadamente 300 exemplares de *Mimagoniates microlepis*, sendo acondicionados em um tambor plástico com capacidade de 20 litros, e transportados imediatamente para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Os peixes passaram por um período de aclimatização de aproximadamente cinquenta dias antes do início

dos experimentos em um aquário de quarentena com capacidade para 100 litros, equipado com aquecedor, termostato e 3 filtros internos.

Durante este período os peixes apresentaram dois tipos de patogenia; o "ictio" (*Ichthyophthirius multifiliis*) e uma doença bacteriana, sendo ambas tratadas de acordo com a rotina de manutenção de aquários (ver anexo).

Além da presença dos filtros, cujo material filtrante (fibra acrílica) era trocado semanalmente, o aquário era sifonado diariamente sendo trocada cerca de 20% da água do aquário neste procedimento, para assegurar uma boa qualidade da água. A água era proveniente de um sistema de filtros de celulose e carvão ativado ligado ao encanamento convencional (Sanepar).

As trocas parciais de água realizadas 24 e 48 horas antes do início do experimento (20% do volume do aquário em cada uma das trocas) foram feitas com água reconstituída para que se inicia-se a aclimatização dos peixes à esta água.

Todos os indivíduos foram alimentados com ração floculada (marca Tetra Tetramin) diariamente em quantidade adequada para o número de indivíduos, sendo que, 48h antes do início dos experimentos, este procedimento foi interrompido.

3.3 - Bioensaios

Para diminuir o risco de contaminação dos demais aquários do laboratório de bioensaios com o chumbo utilizado neste experimento o mesmo foi realizado dentro de capela. Devido às dimensões limitantes da mesma o experimento precisou ser dividido em duas etapas: a primeira com dois aquários controle e oito aquários teste e a segunda com dois aquários controle e seis aquários teste.

Todos os aquários, com capacidade para vinte litros, eram equipados com pedra-porosa impulsionalas por um sistema de aeradores, cuja finalidade era manter a concentração de oxigênio constante (aprox. 8,0 mg/l), além de aquecedores controlados por um termostato eletrônico a fim de manter a temperatura constante (22±2 °C)

Após a adição de dez litros de água reconstituída em cada um dos aquários, esperava-se um período de 12 a 24h para que o sistema atingisse o

equilíbrio físico e químico, sendo então iniciados os experimentos. Antes do início dos experimentos foi verificada a temperatura, o pH e condutividade de cada um dos aquários, fazendo-se as correções necessárias para que todos os aquários estivessem dentro das especificações padrão descritas acima. Neste mesmo período, eram realizadas trocas parciais de água no aquário quarentena, a fim de que no final das 24h os peixes estivessem totalmente adaptados as condições físico-químicas próximas dos aquários controle e aquários teste.

A escolha dos peixes a serem utilizados em cada um dos aquários foi aleatória. Estes foram capturados no aquário quarentena com auxílio de um pequeno puçá e acondicionados em um pequeno recipiente plástico, até um total de dez exemplares que eram então colocados em um dos aquários teste ou controle. Este procedimento foi continuamente repetido até que cada aquário apresentasse dez exemplares de *Mimagoniates microlepis*. Os peixes com mal-formações, doentes ou demasiadamente pequenos eram descartados.

Somente após todos os aquários-teste e controle estarem com seus respectivos peixes é que ocorreu a contaminação com chumbo inorgânico (Pb^{++}).

Para realizar a contaminação foi preparada uma solução estoque contendo 0,5g de $Pb(NO)_3$ em 100ml de H_2O destilada e deionizada. Na primeira etapa do experimento, foram adicionados 160, 320, 640 e 1280 μl da solução estoque em cada dois aquários (réplicas) para obtermos as concentrações de 50, 100, 200, e 400 $\mu g Pb^{++}/l$ respectivamente. Na segunda etapa do experimento foram adicionados 2560, 5120, 10240 e 40960 μl da solução estoque recém preparada em cada dois aquários, para obtermos as concentrações de 800, 1600, 3200 e 12800 $\mu g Pb^{++}/l$ de chumbo respectivamente. A cada fase de contaminação uma nova solução estoque era preparada para diminuir o erro de amostragem. Foram realizadas observações 0, 3, 6, 24, 48,72 e 96 horas após a adição do contaminante para verificar as reações dos animais ao contaminante. Foram anotadas as condições gerais dos indivíduos como mobilidade no aquário, posicionamento na coluna de água e eventuais mortos.

Após o término do experimento os animais contaminados foram sacrificados em uma solução 0,02% de ácido diaminobenzóico. A água, após diluição até 30µg/l (nível máximos permitidos segundo resolução do CONAMA, 1996, foram descartadas diretamente no sistema de esgotos. A água com concentrações muito altas e impossibilitadas de se fazer a diluição, foram filtradas em carvão ativado e depois liberadas no sistema de esgotos. As soluções estoque não utilizadas no experimento foram armazenadas em recipiente de vidro próprio, para posterior descarte através da comissão responsável pelo descarte e controle do lixo tóxico do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4 - RESULTADOS

4.1 - Resultado das análises de disponibilidade do Pb^{++} em água reconstituída

Após a análise das amostras de água com Pb^{++} em diferentes concentrações através do aparelho de espectrofotometria de absorção atômica, foram encontrados os seguintes resultados:

Nos aquários 1 e 2 (50 e 100 $\mu gPb^{++}/l$) a concentração encontrada no tempo 0 (50 e 102 $\mu gPb^{++}/l$ respectivamente) foi bastante próxima à adicionada nos mesmos, o que não ocorreu no aquário 3 onde a concentração adicionada foi 150 $\mu gPb^{++}/l$, e a encontrada 130 $\mu gPb^{++}/l$. Após o tempo 0 houveram variações nas três concentrações ocorrendo inclusive aumento nas mesmas. Apesar das variações terem ocorrido, não foi observado um decréscimo acentuado nas concentrações de 50 e 100 $\mu g/l$, ocorrendo tal fato na concentração de 150 $\mu gPb^{++}/l$, onde em nenhum momento a concentração encontrada foi maior que a adicionada ao aquário (Tabela I e Figuras 2, 3 e 4).

Tabela I- concentração do chumbo dissolvido na água ($\mu gPb^{++}/l$) nos três diferentes aquários testes durante as 96 horas do experimento

Tempo em h	Aquário1(50 $\mu g/l$)	Aquário2(100 $\mu g/l$)	Aquário3(150 $\mu g/l$)
0*	50	102	130
1	51	116	139
4	71	106	118
12	80	125	149
24	80	104	135
36	117	141	119
48	74	140	134
60	65	143	130
72	74	150	126
84	68	144	138
96	80	145	145

*A concentração de Pb^{++} encontrada no aquário controle (branco) (coletada no tempo 0h) foi inferior a 20 $\mu g/l$

Figura 2- Variação da concentração do Pb^{++} ($50\mu g/l$) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.

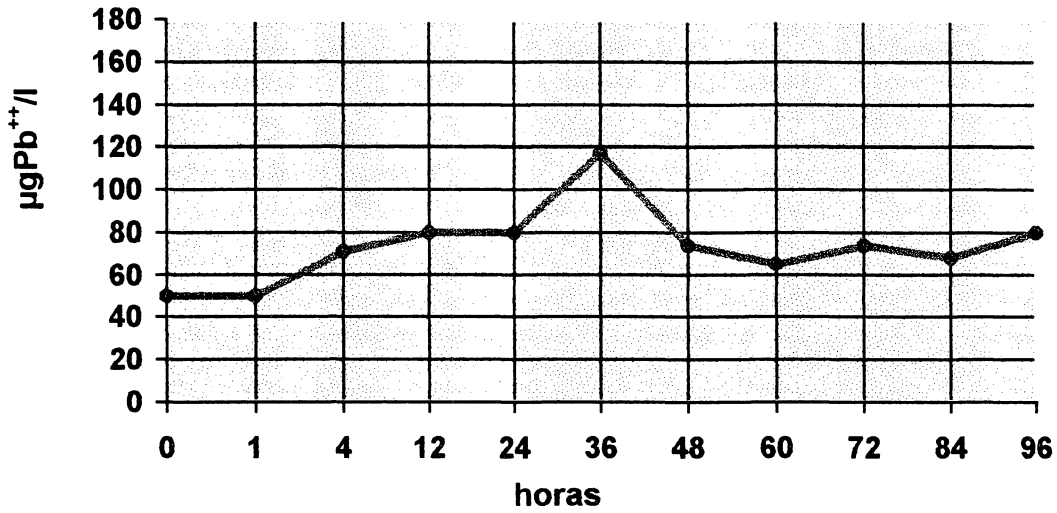


Figura 3- Variação da concentração do Pb^{++} ($100\mu g/l$) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.

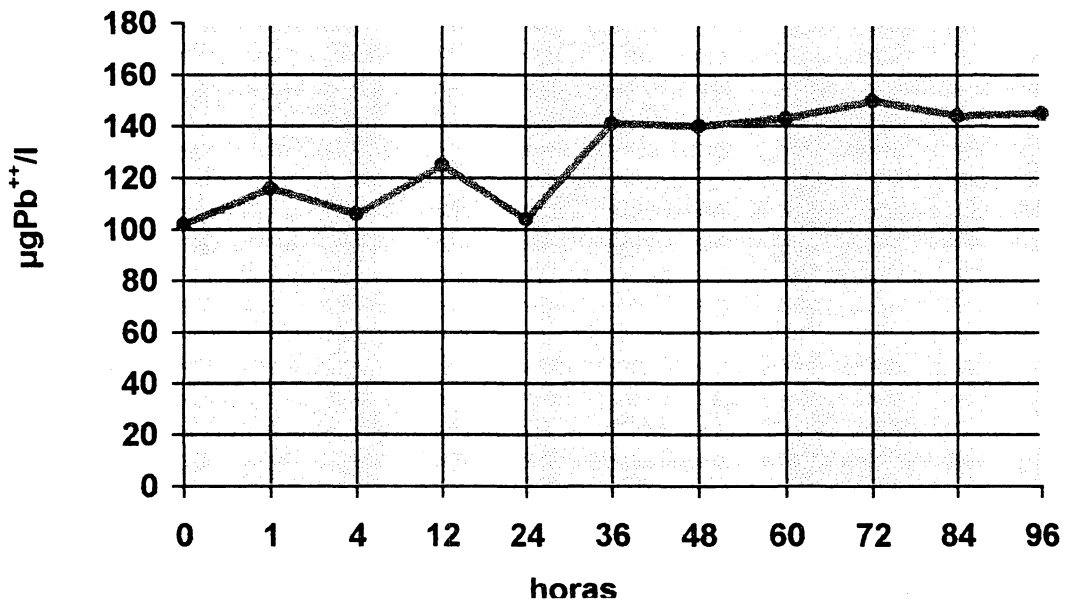
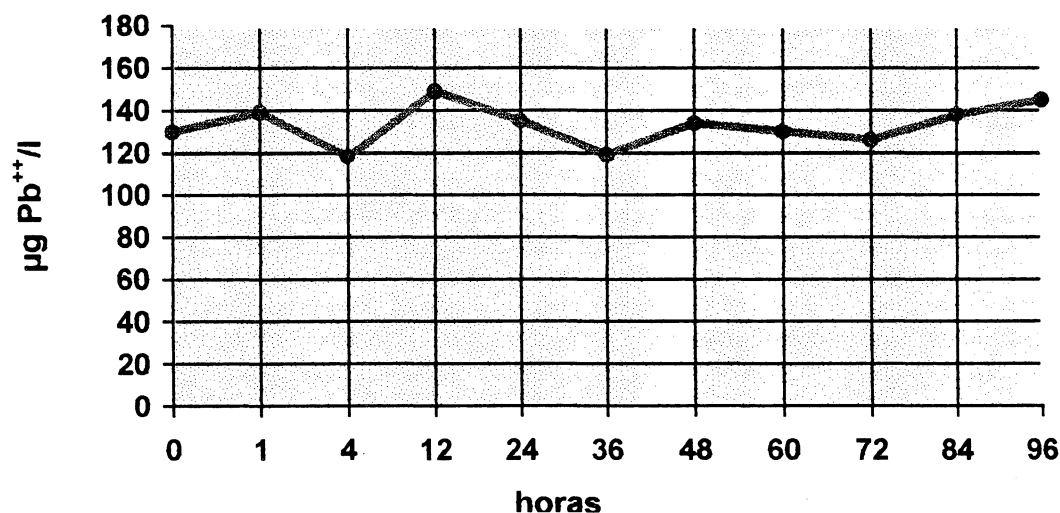


Figura 4- Variação da concentração do Pb^{++} ($150\mu g/l$) dissolvido em 1 litro de água reconstituída em aquário de vidro.



4.2 - Resultados do teste de resistência de *Mimagoniates microlepis* ao Pb^{++} dissolvido na água

Após a realização do teste de resistência de *M. microlepis* ao Pb^{++} dissolvido na água foram compilados os seguintes resultados:

Os exemplares expostos a concentrações de 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu g Pb^{++}/l$ não apresentaram nenhuma variação quanto às condições gerais observadas neste experimento (Tabela II).

Os indivíduos que encontravam-se expostos a concentrações de 1600 e 3200 $\mu g Pb^{++}/l$ diminuíram a mobilidade no aquário aumentaram a frequência dos movimentos operculares e apresentaram variação na intensidade de cores. Os exemplares expostos a 3200 $\mu g Pb^{++}/l$ após as 96 horas, apresentaram ainda uma tendência a permanecer na porção inferior da coluna de água imobilizados, próximo ao fundo do aquário (Tabela II).

Nesta concentração foi encontrado um indivíduo morto após as 96 horas (Tabela III).

Tabela II - Variação nas condições gerais dos indivíduos expostos às diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída, após 96 horas de exposição:

Concentração (μg de Pb^{++} /l)	diminuição da Mobilidade	Distribuição Espacial (fundo)	taxa Respira tória	aumento na intesidade Coloração	Morte
50					
100					
200					
400					
800					
1600	X		X	X	
3200	X	X	X	X	X
12800					X

Os indivíduos que encontravam-se expostos a 12.800 μg Pb^{++} /l morreram após as 96 horas (Tabela IV e Figura 6). Nas observações anteriores (3, 6, 24, 48 e 72 horas) apresentaram sintomas semelhantes às dos exemplares expostos a 3.200 μg Pb^{++} /l em 96 horas.

Tabela III - Número de indivíduos mortos após as 96 horas de exposição nas diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída.

Concentração dos diferentes aquários em (μg /l)	Número de peixes mortos após as 96 horas
0 (controle)	0
50	0
100	0
200	0
400	0
800	0
1600	0
3200	1
12800	20

Em função do número de indivíduos mortos no período do experimento nas respectivas concentrações (Tabela III e Figuras 5 e 6), podemos concluir que a LC-50 de chumbo inorgânico (Pb^{++}) para *Mimagoniates microlepis* situa-se entre as concentrações de 3.200 (1 indivíduo morto) e 12.800 (20 indivíduos mortos) $\mu g Pb^{++}/l$.

Figura 5 - Número de indivíduos mortos após as 96 horas de exposição a diferentes concentrações de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída.

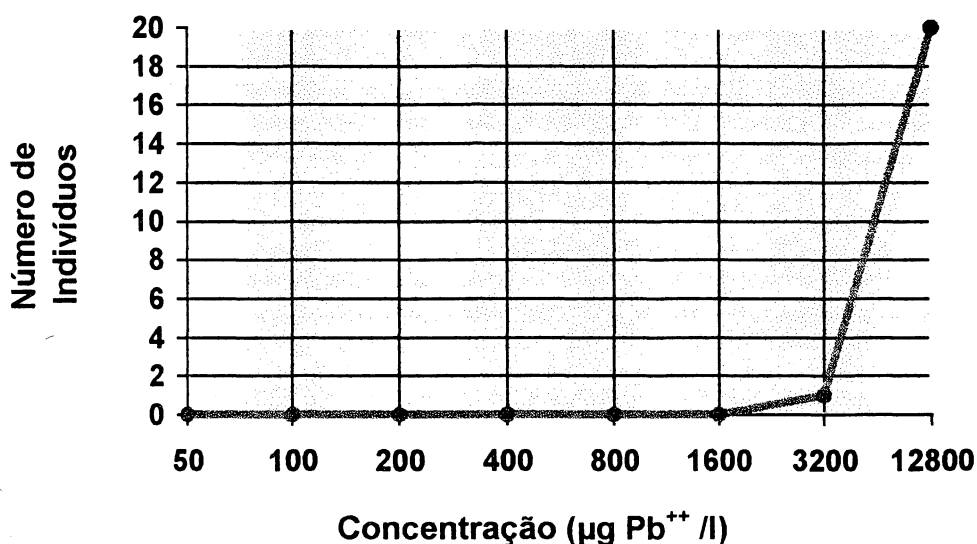
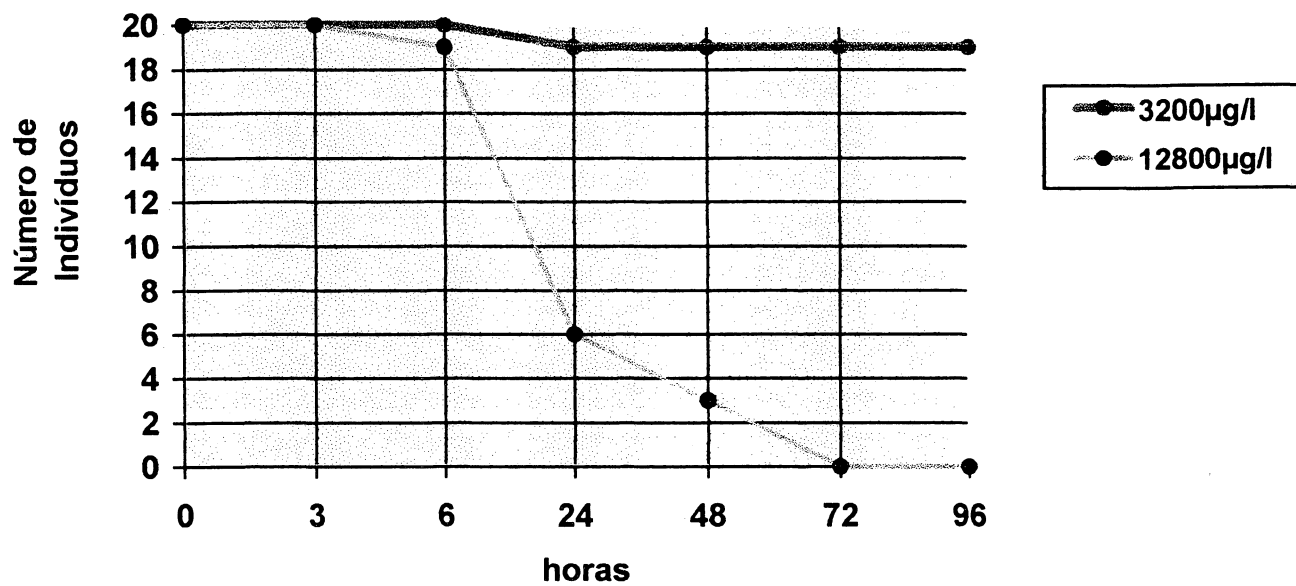


Tabela 4 - Mortalidade de *Mimagoniates microlepis* em 96 horas de exposição às concentrações letais de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída

Tempo (hora)	Taxa de Mortalidade (%)	
	3.200 $\mu g/l$	12.800 $\mu g/l$
0	0	0
3	0	0
6	0	5
24	5	30
48	5	45
72	5	100
96	5	100

Figura 6 - Número de indivíduos sobreviventes durante as 96 horas de exposição às concentrações letais de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída .



5 - DISCUSSÃO

A análise de disponibilidade do chumbo em água reconstituída mostrou-se necessária pois diferentes resultados poderiam interferir nos procedimentos a serem utilizados nos testes posteriores (Barron, 1995).

A análise das amostras de água com Pb^{++} em diferentes concentrações através do espectrofotômetro de absorção atômica, evidenciou uma pequena variação nas respectivas concentrações. Estas variações podem ser explicadas pela baixa sensibilidade do referido aparelho. Inicialmente seria utilizado um espectrofotômetro com forno de grafite, o qual possui uma sensibilidade maior, adequada às concentrações utilizadas. O aparelho que viria a ser utilizado (também de posse do Laboratório da Copel) estragou no decorrer da análise destas amostras e o tempo necessário para o conserto do mesmo inviabilizaria este experimento de ser analisado pelo referido aparelho. A variação para menos na concentração mais alta ($150 \mu g Pb^{++}/l$) pode representar a situação real de perda do Pb^{++} por adsorção ao vidro. Esta perda de Pb^{++} poderia ser crescente até o momento em que todos os sítios de ligação ao Pb^{++} situadas no vidro, estivessem ocupados. Neste momento e nesta concentração então, teríamos a estabilidade química da disponibilidade do Pb^{++} inorgânico na coluna de água. No entanto seria necessário realizar o mesmo experimento com concentrações mais altas para que pudéssemos comprovar esta hipótese.

Apesar da variação encontrada (Figuras 2, 3 e 4), assumimos que esta não seria significativa, corroborando com os dados encontrados na literatura. Sendo assim foi possível a realização do teste de resistência de 96 horas sem a necessidade de adicionar novas doses do contaminante durante este período.

Segundo Weitzman et al. (1996) o íctio ocorre, em baixas densidades, nas áreas onde as espécies de *Mimagoniates* vivem. A variação de ambiente sofrida pelos exemplares coletados, pode ter aumentado a susceptibilidade dos mesmos ao íctio, o mesmo ocorrendo para as bactérias explicando assim o surgimento dos agentes patogênicos.

A escassez de literatura relativas a testes de toxicidade aguda com chumbo e testes de toxicidade com *M. microlepis* dificultaram a realização deste experimento.

Levando-se em consideração dados referentes a testes de toxicidade crônica com chumbo em outras espécies, era esperado que o valor de LC-50 do chumbo para *M. microlepis* estivesse entre 200 e 800 µg/l. Após a realização do experimento foi observado que este valor encontra-se entre 3.200 e 12.800µg/l. O fato de não encontrar o valor esperado resultou na alteração do tipo de experimento (necessidade da realização da segunda etapa do teste de resistência), o qual associado ao tempo de espera pelo resultado das análises das amostras com chumbo, inviabilizou a realização do teste definitivo para a determinação da LC-50. Apesar disto foram obtidos importantes resultados a partir da realização deste experimento abrindo novas perspectivas de estudos de toxicidade com o chumbo e com espécies de peixes neotropicais em especial *M. microlepis*.

6 - CONCLUSÃO

- ✦ Devido à sua facilidade de coleta, manejo, bem com sua ampla distribuição *Mimagoniates microlepis* é uma espécie indicada para ser utilizado em bioensaios porém, devido à sua alta resistência ao chumbo inorgânico (Pb^{++}) não se apresenta como um bom modelo biológico para testes de toxicidade com este metal
- ✦ A concentração de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída em aquários de vidro diminui para a concentração de 150 $\mu gPb^{++}/l$ após 96 horas
- ✦ Não foi possível verificar se a concentração chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída em aquários de vidro diminui para a concentração de 50 e 100 $\mu gPb^{++}/l$ se altera após 96 horas, devido a baixa sensibilidade do aparelho utilizado
- ✦ É necessário realizar outros experimentos de avaliação da disponibilidade de chumbo inorgânico (Pb^{++}) dissolvido em água reconstituída, utilizando concentrações mais altas, para encontrar o tempo e a concentração de estabilidade do chumbo inorgânico nestas condições
- ✦ A LC-50 do chumbo inorgânico (Pb^{++}) para *Mimagoniates microlepis* encontra-se entre 3200 e 12800 $\mu g/l$.

7 - BIBLIOGRAFIA

- ABNT. **Água- ensaio de toxicidade aguda com peixes.** Parte I.1993.a. Ed. ABNT. Rio de Janeiro-RJ
- ABNT. **Água- ensaio de toxicidade aguda com peixes.** Parte II. 1993.b. Ed. ABNT. Rio de Janeiro-RJ
- ABNT. **Água- ensaio de toxicidade aguda com peixes.** Parte III. 1993.c. Ed. ABNT. Rio de Janeiro-RJ
- ANDREWS, C.; EXELL, A. and CARRINTON, N.; 1988. **The Manual of Fish Health.** 1988. Salamander Books Ltd. London-UK.
- BARRON, M.G.; 1995. **Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms.** Ed. CRC Press, Inc.
- BRODY, T.M. 1997. **Farmacologia Humana.** Ed Guanabara Kooga. Rio de Janeiro-RJ
- CETESB. 1991. **Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes e Organismos Aquáticos.** 1-29 São Paulo-SP.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. 1983. **Revised Report on Fish Toxicity Testing Procedures.** Ed. Eifac. Rome-Italy.
- HODSON, P.V.; BLUNT, B.R and WHITTLE, M. 1984. **Monitoring Lead Exposure of Fish.** John Winley & Sons, Inc. Canadá.
- JEFFRIES, M. and MILLS, D. 1994. **Freshwater Ecology.** Ed. John Winley & Son Ltd. England.
- LARINI, L. 1997. **Toxicologia.** Ed. Manole Ltda. São Paulo-SP
- MANAHAN, S.E. 1992. **Toxicological Chemistry.** Lewis Publishers Inc. Michigan- USA
- OGA, S. 1996. **Fundamentos de toxicologia.** Ed. Atheneu. São Paulo- SP
- PELLETIER, E. 1995. **Environmental Oganometallic Chemistry do Mercury, Tin, and Lead: Present Status and Perspectives.** John Winley & Sons Ltd.- Canadá
- RAMSHORT, J.D.V. 1991. **The Complete Aquarium Enciclopedia of Tropical Freshwater Fishes.** Promotional Company Limited for Bookmark Limited . United Kingdon.

- SABINO, J. e CASTRO, R.M.C., 1990. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial de peixes de um riacho da Floresta Atlântica (sudeste do Brasil). *Revista Brasileira de Biologia* 50(1): 23-36.
- VIGHI, M. 1981. **Lead Uptake and Release in a Experimental Trofic Chain** *Ecotoxicology and Enviromental Safety* 5, 177-193.
- WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A. and WEITZMAN, M.J. 1988. **Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (teleostei: characiformes, characidae) with commentson the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil.**
- WEITZMAN, S .H.; PALMER, L.; MENEZES, N.A. and BURNS, J.R. 1996. a. **Maintaining Environmental Conditions Suitable for Tropical and Subtropical Forest-adapted Fishes, Especially the Species of *Mimagoniates*** (part 2) *Tropical Fish Hobbyst*, 485: 196-201.
- WEITZMAN, S.H.; PALMER, L.; MENEZES, N.A. and BURNS, J.R. 1996. b. **Breeding and Rearing *Mimagoniates* Species, Internally Fertilized Tetras.** *Tropical Fish Hobbyst*, 486: 196-205.

8 - ANEXOS

8.1 - Íctio (*Ichthyophthirius multifiliis*)

O íctio, também conhecido como doença de pontos brancos é causado, nos ambientes dulcícolas, pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*.

Pequenos pontos brancos de aproximadamente 1 milímetro ao longo da superfície do corpo, nadadeiras e brânquias caracterizam a contaminação pelo íctio. Contaminações secundárias por bactérias são comuns. Quando parasita as brânquias o íctio causa uma irritação levando o órgão a uma superprodução de muco. Peixes infectados apresentam portanto um quadro de anóxia (aumento da frequência respiratória) causada pela redução na eficiência das brânquias.

O parasita é encontrado na epiderme em uma cavidade coberta por células epidérmicas. Quando o protozoário esta maturo ele rompe a cavidade, deixa o hospedeiro e nada até um substrato onde então encista. A célula encistada sofre então divisões sucessivas resultando entre 1000 e 2000 células filhas (ciliósporos) num período de aproximadamente 24 horas. Estes ciliósporos então rompem o cisto e saem em busca de um hospedeiro. A 25°C este ciclo dura aproximadamente 5 dias (Andrews et al., 1988) . O produto utilizado para o combate ao íctio foi o azul de metileno. É o medicamento mais utilizado devido a sua menor toxicidade para o peixe. É empregado na concentração de 2 a 4mg/l durante uma semana (Ramshort,1991)

Sais de quinino são também empregados no tratamento do íctio na concentração de 10mg/l assim como o verde de malaquita, usado na concentração de 0,05mg/l. Todos estes produtos devem ser mantidos no aquário por pelo menos uma semana (Ramshort,1991).

Existem ainda produtos vendidos em lojas de aquários especialmente formulados para o combate ao ictio. Estes produtos apresentam normalmente o azul de metileno em sua composição.

Alguns peixes como alguns bagres são sensíveis a estes tratamentos. Nestes caso esta patogenia pode ser controlada subindo a temperatura do aquário até pelo menos 32 °C por algumas horas por dia durante cinco dias.

8. 2 - Doenças bacterianas

Pouco se sabe a respeito de doenças bacterianas em peixes tropicais. Os gêneros mais freqüentes são *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flexibacter*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (Ramshort,1991). Elas aparecem normalmente associadas a uma queda na resistência do animal infectado ou à má qualidade da água. Estas doenças apresentam características distintas; bem como tratamento de acordo com o agente causador. A espécie causadora da patogenia ocorrida durante o experimento era provavelmente do gênero *Flexibacter*.

Esta doença é reconhecida devido ao surgimento de áreas pálidas ao longo do corpo do animal de tons amarelos e brancos. Ela é altamente contagiosa e pode levar um grande número de indivíduos a óbito em poucos dias.

O tratamento utilizado foi a tetraciclina em doses de 25mg/l a cada 24 horas durante três dias (três doses). Pode também ser utilizado o Nifurpirinol em solução de 0,25mg/l (Ramshort, 1991), ou bactericidas vendidos em lojas de aquários para este fim.