

NILCE MARY TURCATTI FOLLE

**HISTOPATOLOGIA DOS EFEITOS DA INTERAÇÃO  
DE MERCÚRIO INORGÂNICO E ÁGUA  
ACIDIFICADA EM NÍVEIS SUBLETAIS NO PEIXE  
*Metynnis roosevelti* [Eigenmann, 1915]**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

ORIENTADORA:

Doutora Edith Susana Elisabeth Fanta

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Departamento de Ciências Veterinárias

CURITIBA

1997

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA,

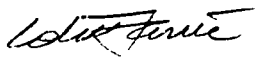
APROVA A TESE

**HISTOPATOLOGIA DOS EFEITOS DA INTERAÇÃO DE  
MERCÚRIO INORGÂNICO E ÁGUA ACIDIFICADA EM  
NÍVEIS SUBLETAIS NO PEIXE**  
*Metynnis roosevelti (Eigenmann, 1915)*

ELABORADA PELA

**BIÓLOGA**  
**NILCE MARY TURCATTI FOLLE**

COMISSÃO EXAMINADORA:

  
**PROFA. DRA. EDITH SUSANA ELISABETH FANTA**  
**PRESIDENTE/ORIENTADORA**

  
**PROF. DR. METRY BACILA**  
**MEMBRO EFETIVO**

  
**PROF. DR. WALDEMIRO GREMSKI**  
**MEMBRO EFETIVO**

**CURITIBA**  
**1997**

*“Quando se vê um estilo natural,  
ficamos surpreendidos porque esperávamos encontrar  
um autor e encontramos um homem”*

*Blaise Pascal*

## DEDICATÓRIA

À Paulo, pelo amor e paciência.

À Gabriela minha mais nova fonte de inspiração.

Às cobaias involuntárias utilizadas neste trabalho, cujo sofrimento causado possa guiar os passos da humanidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Dra. Edith Fanta, mestre e amiga, que dentro de sua filosofia de trabalho fez-me amadurecer.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR, na pessoa de seus coordenadores, Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk e Dra. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Tânia Mara Schrank e Deleuse Cherobim pelo auxílio e amizade.

Ao Dr. Metry Bacila, pela sua disposição em incentivar e contribuir com o trabalho dos pós-graduandos.

Ao CNPq pela concessão de Bolsa de Estudos durante o período de desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Dra. Maria Célia Jamur.

Aos integrantes do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, e em especial à Dra. Daura Eiras-Stofella e às técnicas Vera Regina F. Pionteke e Matilde M. de Oliveira, pela colaboração na obtenção do material de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Às Biólogas Ana Cristina C. Vianna e Sonia Regina Grötzner, pelo auxílio na obtenção do material fotográfico que compõe este trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Estudos de Impacto Ambiental, Edith Fanta, Sonia Grötzner, Ana Meyer, Lucélia Donatti, Sandra Freiburger, Flavia Sant'ana Rios, Ana

Cristina Vianna, Silvia Zanetti da Cruz, Sandaly Oliveira da Silva e Edson Rodrigues, que tornaram mais agradável esta longa jornada.

Às colegas do Curso de Pós-Graduação Cleoni dos Santos Carvalho, Ariane Guassú, Solange Ribas e Lygia Salvo, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, mestre e amigo, que pela força do destino foi o responsável pelo meu engajamento nesta linha de pesquisa.

À Profa. Dulce Antoniutti, pelo apoio e incentivo.

À Nilva, Melissa, Shirlei e Angela, amigas com quem pude contar nos momentos mais difíceis.

À Carla Pimenta que, pelas suas indagações, me fez seguir com mais certezas.

À Lucélia Donatti, pelos longos e agradáveis “papos” que sempre davam um gostinho de: quero mais!

À Dimas Clemente pelo auxílio na impressão final da tese.

À Ana Tereza Guimarães pela ajuda nos recursos de computação e amizade.

Com muito carinho e amor à minha mãe e a meu pai, pelo enorme incentivo, dedicação e sacrifícios nunca medidos em todos os momentos.

A todos os familiares, amigos, colegas, professores e funcionários da UFPR que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivo específico.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1. Material Biológico.....	11
3.2. Aclimação.....	13
3.3. Arranjo Experimental.....	14
3.3.1. Definição da faixa subletal para os agentes tóxicos.....	14
3.3.1.1. Acidificação da água.....	14
3.3.1.2. Contaminação por mercúrio.....	15
3.3.2. Teste dos agentes tóxicos isolados e em conjunto.....	16
3.4. Obtenção das amostras teciduais.....	19
3.5. Processamento para Microscopia Óptica.....	20
3.6. Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	21
4. Resultados.....	22
4.1 Características normais da espécie.....	22
4.1.1 Morfologia.....	22
4.1.1.1 Brânquias.....	22
4.1.1.2 Fígado.....	23
4.1.2 Comportamento.....	23
4.2 Definição da faixa subletal para os agentes tóxicos.....	25
4.2.1 Acidificação da água.....	25
4.2.1.1 Mortalidade.....	25
4.2.1.2 Comportamento.....	25
4.2.1.3 Histopatologia.....	25
4.2.2 Contaminação por mercúrio.....	26
4.2.2.1 Mortalidade.....	26
4.2.2.2 Comportamento.....	26
4.2.2.3 Histopatologia.....	27
4.3 Efeito dos agentes tóxicos em nível subletal.....	28
4.3.1 Efeito isolado da água acidificada a pH 5,0.....	28
4.3.1.1 Histopatologia da brânquia.....	28
4.3.1.3 Histopatologia do fígado.....	30
4.3.2 Efeito isolado da contaminação por mercúrio a 0,1mg Hg/L.....	31
4.3.2.1 Histopatologia da brânquia.....	31

4.3.2.2 Histopatologia do fígado.....	33
4.3.3 Efeito da ação integrada do mercúrio a 0,1 mg Hg/L e de água acidificada a pH 5,0.....	34
4.3.3.1 Histopatologia da brânquia.....	34
4.3.3.2 Histopatologia do fígado.....	36
5. Discussão.....	54
6. Conclusões.....	65
Apêndice 1: Soluções e corantes.....	67
Apêndice 2: Coloração em microscopia óptica.....	71
Referências Bibliográficas.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Metynnis roosevelti</i> Eigenmann, 1915.....	13
Figura 2	Vista geral do arranjo experimental.....	18
Figura 3	A. Arcos branquiais direitos.....	40
	B. Vista superficial da estrutura branquial.....	40
	C. Secção longitudinal das lamelas branquiais.....	40
	D. Visão superficial da porção terminal das lamelas primárias.....	40
	E. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias.....	40
Figura 4	A. Vista superficial das lamelas secundárias.....	41
	B. Secção longitudinal das lamelas primárias.....	41
Figura 5	A. Secção do tecido hepático.....	42
	B. Secção do tecido hepático.....	42
Figura 6	A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada a pH 5,0.	43
	B. Secção do tecido hepático em água acidificada a pH 5,0.....	43
	C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em 0,1 mgHg/L.....	43
	D. Secção longitudinal das lamelas branquiais em 0,05 mgHg/L.....	43
	E. Secção do tecido hepático em 0,1 mgHg/L.....	43
	F. Secção do tecido hepático em 0,05 mgHg/L.....	43
Figura 7	A. Secção das lamelas branquiais em água acidificada 2h.....	44
	B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 2h.....	44
	C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 4h.....	44

	D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 4h	44
	E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 8h.....	44
	F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 8h.	44
Figura 8	A. Vista superficial da porção apical das lamelas primárias em água acidificada 8h.....	45
	B. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 24h.....	45
	C. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 24h .....	45
	D. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 48h.....	45
	E. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 48h.....	45
Figura 9	A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 96h.....	46
	B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em água acidificada 96h.....	46
	C. Secção do tecido hepático em água acidificada 2h.....	46
	D. Secção do tecido hepático em água acidificada 4h.....	46
	E. Secção do tecido hepático em água acidificada 8h.....	46
	F. Secção do tecido hepático em água acidificada 24h.....	46
Figura 10	A. Secção do tecido hepático em água acidificada 48h.....	47
	B. Secção do tecido hepático em água acidificada 96h.....	47
	C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 2h.....	47
	D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 2h.....	47
	E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 4h.....	47

	F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 4h.....	47
Figura 11	A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 8h.....	48
	B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 8h.....	48
	C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 24h.....	48
	D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 24h.....	48
	E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 48h.....	48
	F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 48h.....	48
Figura 12	A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em mercúrio 96h.....	49
	B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em mercúrio 96h.....	49
	C. Vista superficial da porção apical das lamelas primárias em mercúrio 96h.....	49
	D. Secção do tecido hepático em mercúrio 2h.....	49
	F. Secção do tecido hepático em mercúrio 4h.....	49
Figura 13	A. Secção do tecido hepático em mercúrio 8h.....	50
	B. Secção do tecido hepático em mercúrio 24h.....	50
	C. Secção do tecido hepático em mercúrio 48h.....	50
	D. Secção do tecido hepático em mercúrio 96h.....	50
	E. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 2h.....	50
	F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 2h.....	50
Figura 14	A. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 4h.....	51

B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 4h.....	51
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 8h.....	51
D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 8h.....	51
E. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 24h.....	51
F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 24h.....	51
Figura 15 A. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 48h.....	52
B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 48h.....	52
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais expostas ao mercúrio em ambiente ácido 96h.....	52
D. Vista superficial da porção apical das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 96h.....	52
E. Vista superficial da porção apical das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 48h.....	52
F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 96h.....	52
Figura 16 A. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 2h.....	53

B. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 4h.....	53
C. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 8h.....	53
D. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 24h.....	53
E. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 48h.....	53
F. Secção do tecido hepático em mercúrio em ambiente ácido 96h.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alterações morfológicas no tecido branquial.....	38
Tabela 2	Alterações morfológicas no tecido hepático.....	39

## RESUMO

A poluição por mercúrio e águas ácidas tem sido reconhecida em muitas áreas do mundo por interferir na saúde dos organismos. Assim sendo este trabalho tem por objetivo investigar os efeitos da interação de mercúrio inorgânico e água acidificada em um peixe nativo.

Exemplares do peixe *Metynnis roosevelti* foram expostos aos agentes tóxicos mercúrio inorgânico (0,1 mgHg/L), água acidificada com ácido sulfúrico em pH 5,0 e a estes em conjunto, permanecendo em 2, 4, 8, 24, 48 e 96 horas em exposição. Os animais tiveram os tecidos branquial e hepático retirados e fixados para serem estudados através de microscopia óptica e eletrônica de varredura.

As histopatologias observadas no tecido branquial sob o efeito de água acidificada, mercúrio e mercúrio em água acidificada foram: enrugamento epitelial, núcleos picnóticos, degeneração celular, células com formatos irregulares, constrição dos espaços sanguíneos, grânulos eosinofílicos, hiperplasia, diminuição das microvili das células epiteliais das lamelas primárias e ruptura epitelial. As histopatologias separação do epitélio lamelar e congestão sanguínea foram observadas em exposição ao mercúrio e mercúrio em água acidificada. As histopatologias hepáticas foram: vacuolização citoplasmática, degeneração celular, necrose celular, inchaço celular, grânulos eosinofílicos nas hemácias e grânulos amarelo-marrons nos hepatócitos.

A intensidade das histopatologias observadas foi mais intensa na exposição do peixe *Metynnis roosevelti* ao mercúrio inorgânico em água acidificada. Desta forma pode-se concluir que, mesmo todos os agentes tóxicos estando em níveis subletais, o efeito do mercúrio foi potencializado em um ambiente ácido.

## ABSTRACT

Pollution by mercury and by acid water has been recognised in many places, all over the world. Both agents cause a weakening of the state of health of different organisms. Thus, this study has as objective the investigation of the effects of the action of sublethal levels of acidified water, in a brazilian fish *Metynnis roosevelti*.

Fish test were made with 0,1 mgHg/L, with acidified water pH5,0 and with both toxic agents together. After 2, 4, 8, 24, 48 and 96 hours of exposure, branchiae and liver were extracted and fixed for optical and scanning electron microscopy.

Some pathological changes observed in the branchiae were common to all tests with the pollutants: epithelial shrivelling, nuclear picnosis, cellular degeneration, irregular shaped cells, constriction of blood spaces, eosinophylic grains in the cells, hiperplasia, diminution of microridges at the surface of epithelial cells of primary lamellae, epithelial rupture. Lifting of lamellae epithelium and blood congestion were observed after exposure to mercury and mercury in acidified water.

Pathological changes in the liver were: increased cytoplasm vacuolisation, swelling, degeneration and necrosis of hepatic cells, eosinophylic grains in the hepatocytes.

When *Metynnis roosevelti* is exposed to mercury in acid water, the pathologies are more intense. Therefore on can conclude that, even if all agents are present in sublethal levels, the effect of mercury is potencialized in an acid environment.

## 1. INTRODUÇÃO

As águas continentais constituem biocenoses com inúmeros elementos e múltiplas cadeias alimentares que englobam desde microorganismos, bactérias, algas e fungos até invertebrados e seres superiores. Nestes meios o equilíbrio iônico de sais minerais e de substâncias orgânicas é complexo e, na maioria das vezes, extremamente frágil. É exatamente neste meio frágil que vão agir as substâncias tóxicas imprudentemente espalhadas pelo homem.

Os metais pesados são considerados como uma das formas mais nocivas de poluição ambiental (THURBERG e DAWSON, 1974; CHRISTENSEN, 1975; CHRISTENSEN et al., 1977; KLING e SOARES, 1977; THURBERG e COLLIER, 1977; GLICKSTEIN, 1979; DELAMARRE e TRUCHET, 1984; NEUHOFF e THEEDE, 1984; THOMAS e WOFFORD, 1984; PELLETIER, 1985; REDDY e CHARI, 1985; JORGENSEN e HEISINGER, 1987; CUVIN e FURNESS, 1988; REDDY et al., 1988; BOROVYAGIN et al., 1989; BOUDOU e RIBEYRE, 1989; CYRIAC et al., 1989; MICALLEF e TYLER, 1990; BAATRUP, 1991; CARVALHO e LACERDA, 1992; ARAUJO et al., 1993; ALLEN, 1994b; AL-SABTI, 1994; GLYNN et al., 1994; OKAMURA e AOYAMA, 1994). Estes não são degradáveis e tendem a acumular-se nos organismos vivos causando, desde a intoxicação e o envenenamento, até a dizimação da biota.

O mercúrio é um dos metais pesados que vem causando profundos distúrbios ecológicos (BAKIR et al., 1973; TSUBAKI e IRUKAYAMA, 1977; D'ITRI e D'ITRI, 1978; DELAMARRE e TRUCHET, 1984; BANO e HASAN, 1990; OSKARSSON et al., 1990; JOHNSTON e SAVAGE, 1991; GUIMARÃES, 1992). Sua presença em águas, sedimentos e seres vivos vem sendo detectada, em vários países, em níveis mais elevados do

que os permitidos por entidades ambientalistas (DIAZ et al., 1994; COOPER, 1983; HAMMOND, 1971; MORTIMER e KUDO, 1975; EVANS, 1986; TOLLEFSON e CORDLE, 1986; NORHEIM et al., 1986; HAKANSON et al., 1988; MALM et al., 1990; LACERDA et al., 1989; GLASS e LEONARD, 1986; LINDESTROM e GRAHN, 1982; PFEIFFER et al., 1991; BARREGARD, 1993; BJORKLUND et al., 1984; MARTINELLI et al., 1988; GLYNN et al., 1994).

A entrada do mercúrio no ambiente aquático tem origem natural e, principalmente, antropogênica. Certas atividades humanas nas indústrias, na mineração, na agricultura, em hospitais e nos consultórios odontológicos (JARDIM, 1983; CÂMARA et al., 1990; BENNETT, 1981; STOCK e JAENSCH, 1983; LOCKWOOD, 1976; ARAUJO et al., 1993) vêm aumentando a dispersão do mercúrio.

A mineração, no Brasil, é a atividade que mais contribui para a poluição do ambiente por mercúrio (PFEIFFER e LACERDA, 1988; LACERDA, 1990; JARDIM, 1983). Há uma estimativa de que a região Amazônica é responsável por cerca de 1% das emissões globais totais de mercúrio para a atmosfera e 6% das emissões antropogênicas (PFEIFFER e LACERDA, 1988). Estimativas recentes sugerem que cerca de 900 a 1.200 toneladas de mercúrio foram lançadas na Amazônia Legal na última década (LACERDA, 1990).

As formas de mercúrio encontradas no ambiente e nos organismos são principalmente as de sais inorgânicos e compostos orgânicos (JARDIM, 1983; FAGERSTRON e JERNELOV, 1972; BROSSET, 1987; JOHNSTON e SAVAGE, 1991; GUIMARÃES, 1992; STARY et al., 1980; BAATRUP, 1991).

A capacidade de converter formas inorgânicas de mercúrio em orgânicas de metil e dimetilmercúrio foi evidenciada em microorganismos da interface sedimento-água, em bactérias presentes na flora intestinal e em fígado de peixes (JERNELOV e LANN, 1971; MATSUMURA et al., 1975; RUDD et al., 1980; HANDY e PENRICE, 1993). Esta

capacidade pode alterar-se em condições ácidas (XUN et al., 1987; RICHMAN et al., 1988; STEFFAN et al., 1988).

A meia-vida do metilmercúrio no peixe *Poecilia reticulata* foi determinada em aproximadamente 110( $\pm$ 20) dias (STARY et al., 1980). Para o mercúrio inorgânico foi estipulada uma meia-vida de 2 a 5 vezes menor que a do orgânico (TOLLEFSON e CORDLE, 1986).

Muitos autores têm estudado a acumulação das formas mercuriais em vários tecidos e órgãos dos peixes (JULSHAMN et al., 1982; PETERSON et al., 1994; PHILIPIS e BUHLER, 1978; BOSE et al., 1993; OLSON et al. 1975; SINOVCIC et al., 1980; PASSINO e KRAMER, 1982; PELLETIER e LAROCQUE, 1987; PELLEGRINI e BARGHIGIANI, 1989; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1995; HIBIYA e OGURI, 1961; FILENKO et al., 1988; ALLEN, 1994b; HANDY e PENRICE, 1993; SKAK e BAATRUP, 1993; BAATRUP et al., 1986; BAATRUP e DOVING, 1990; ARAUJO et al., 1993; TOLLEFSON e CORDLE, 1986; BAATRUP, 1991; WREN et al., 1986).

Verificou-se que vários são os fatores que contribuem para a bioacumulação do mercúrio, dentre eles: a forma mercurial (AKYAMA, 1970; WOBESER, 1975b; STUDNIKA, 1984), o tempo de exposição (McKIM et al., 1976; SHARP e NEFF, 1980), sua concentração na água (AKYAMA, 1970; WOBESER, 1975a; STUDNIKA, 1984 ; McKIM et al, 1976; SHARP e NEFF, 1980), a espécie (NICOLETTO e HENDRICKS, 1988), o peso corporal e a fase de desenvolvimento (BOETUS, 1960; AKYAMA, 1970; WOBESER, 1975b; McKIM et al., 1976; COOPER, 1983; SCHOFIELD et al., 1994), a dieta (AKIELASZEK e HAINES, 1981; PFEIFFER e LACERDA, 1988; HAKANSON, 1980; JERNELOV e LANN, 1971), a taxa metabólica ou a taxa de eliminação dos tecidos (OLSON et al., 1973) e a presença de gorduras (EYSINK, 1990).

Vários pesquisadores verificaram que o mercúrio não possui função biológica mas causa distúrbios nas funções fisiológicas e metabólicas do organismo. Seu efeito tóxico reside na forte interação com o enxofre de radicais sulfidrilas presentes em estruturas celulares (ALLEN et al., 1988; BAATRUP, 1991; BARGHIGIANI et al., 1989; NICHOLLS et al., 1989; HEISINGER e WAIT, 1989; THOMAS e WOFFORD, 1984). O mercúrio ataca componentes celulares com grupamentos fosfatos e as cisteínas, metioneínas e histidinas das proteínas causando alterações estruturais e inibição de enzimas pelo bloqueamento dos grupos sulfidrilas ou por substituição ao zinco. O mercúrio também se liga e afeta a configuração de purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos e interfere com a integridade e propriedades físicas das membranas celulares (BAATRUP, 1991).

Investigações sobre os efeitos tóxicos do mercúrio em estruturas celulares vêm sendo desenvolvidas sob os mais diferentes aspectos, tais como: a permeabilidade da membrana (WILKINSON et al., 1993; FARMANFARMAIAN et al., 1988; STINSON e MALLATT, 1989; BALLATORI et al., 1988), as atividades enzimáticas (ARAUJO et al., 1993; RAM e JOY, 1988; GILL e PANT, 1981; CHRISTENSEN, 1975; RAM e SATHYANESAN, 1985; BALLATORI et al., 1988; REDDY et al., 1988; RANA e SHARNA, 1982; NICHOLLS et al., 1989), o comportamento de neurotransmissores (REDDY e CHARI, 1985), a bioquímica do sangue (CYRIAC et al., 1989; CHRISTENSEN et al., 1977; AZIZ e SHAKOORI, 1992; ALLEN, 1994a; CYRIAC et al., 1989; FLETCHER e WHITE, 1986), as respostas secretórias (VARANASI et al., 1975; RAM e JOY, 1988; LOCK e VAN-OVERBEEKE, 1981; RAM e SATHYANESAN, 1985; JOY e KIRUBAGARAN, 1989; KIRUBAGARAN e JOY, 1991 e 1994; CHRISTENSEN, 1975; JORGENSEN e HEISINGER, 1987; SNARSKI e OLSON, 1982) e as respostas mutagênicas e carcinogênicas (WEIS, 1984; Al-SABTI, 1994; CHRISTENSEN et al., 1977).

Estudos ultraestruturais e histopatológicos decorrentes da ação mercurial têm sido realizados em diferentes órgãos como, por exemplo, nas brânquiais (HANDY e PENRICE, 1993; KHANGAROT e SOMANI, 1980; PEREIRA, 1988; DAOUST et al., 1984 ; MALLATT, 1985; WOBESER, 1975a), na pele (BOROVYAGIN et al.,1989, OLIVEIRA RIBEIRO e TORRES, 1995), no fígado (BANO e HASAN, 1990; STUDNICKA, 1984), no rim (DELAMARRE e TRUCHET, 1984; FLETCHER e WHITE, 1986; BANO e HASAN, 1990; BAATRUP et al., 1986 ; HANDY e PENRICE, 1993; STUDNICKA, 1984), no intestino, no baço e nas gônadas (BANO e HASAN, 1990), no sistema nervoso (CHANG e HARTMANN, 1972; KIRUBAGARAN e JOY, 1991) e no tecido muscular (STUDNICKA, 1984).

A investigação comportamental tem se baseado na análise de sintomas individuais como: frequência respiratória, coordenação motora e equilíbrio (SKAK e BAATRUP, 1993; FILENKO et al., 1988) e em relações intraespecíficas (HALLER, 1988) e interespecíficas (KANIA e O'HARA, 1974).

Alguns trabalhos têm procurado identificar substâncias capazes de reduzir os efeitos do mercúrio no organismo, dentre elas: a cisteína (SPINELLI et al., 1973; JOHNSTON e SAVAGE, 1991), a vitamina E e os antioxidantes (JOHNSTON e SAVAGE, 1991), a metalotioneína (WEIS, 1984) e o selênio ( JORGENSEN e HEISINGER, 1987; CUVIN e FURNESS, 1988; KLING e SOARES, 1977; AL-SABTI, 1994; PELLETIER, 1985). O selênio tem ação protetora controvertida já que não foi evidenciada nos trabalhos de BAATRUP et al. (1986) e PELLETIER (1988).

Diversos fatores têm sido salientados como determinantes do grau de toxicidade do mercúrio nos peixes, tais como: a forma mercurial (WOBESER, 1975b; STUDNIKA, 1984; AKYAMA, 1970) e certas condições ambientais como a presença de outros metais no ambiente (JORGENSEN e HEISINGER, 1987; CUVIN e FURNESS, 1988; KLING e

SOARES, 1977; AL-SABTI, 1994; PELLETIER, 1985; BAATRUP, 1989; PELLETIER, 1988; RODGERS e BEAMISH, 1983), a temperatura (VERMA et al., 1984; BOETUS, 1960), a concentração de oxigênio dissolvido (VERMA et al., 1984; JACKSON, 1988), a salinidade (BOETUS, 1960), a concentração de carbono orgânico (McMURTRY et al., 1989; RICHARDSON et al., 1995; JACKSON, 1988), e a acidez (RODGERS e BEAMISH, 1983; RICHARDSON et al., 1995; VERMA et al., 1984; WAKABAYASHI et al., 1987; RAMLAL et al., 1985; WREN et al., 1986; VIENER et al., 1990; WREN et al., 1991; WIENER et al., 1990; DRUMMOND et al., 1974; SPRENGER et al., 1988; WREN e STOKES, 1988; JENSEN, 1988; HAKANSON, 1980; RICHMAN et al., 1988; WREN e MacCRIMMON, 1983; BLOOM et al., 1991).

Como referido acima, o comportamento do mercúrio e sua toxidez no organismo animal depende de sua interação com fatores ambientais, dentre eles a acidez da água.

Investigações têm comprovado que, nestas duas últimas décadas, a acidificação ambiental por fontes antropogênicas vêm aumentando em países como os Estados Unidos (BAKER et al., 1991), os países escandinavos (SCHOFIELD et al., 1994; WISNIEWSKI e KEITZ, 1983; GORHAM et al., 1984; LEIVESTAD e MUNIZ, 1976), o Canadá (BEAMISH, 1976; SHAW, 1979), a Índia e a China (RODHE et al., 1992; GALLOWAY et al., 1987) e em países tropicais em desenvolvimento (GALLOWAY e COSBY JR, 1979). Esse aumento na acidificação ambiental pode gerar uma complicação adicional se somado à ação do mercúrio nos organismos. Assim, RODGERS e BEAMISH (1983) observaram o aumento da absorção do mercúrio por peixes em água de baixa alcalinidade. WREN e MacCRIMMON (1983) verificaram o efeito do mercúrio na taxa de crescimento de peixes submetidos ao estresse de águas ácidas. DRUMMOND et al., (1974), estudaram o efeito do mercúrio em águas ácidas na frequência de tosse no peixe *Salvelinus fontinalis*.

As águas naturais podem ser acidificadas quando, na atmosfera, substâncias como óxidos de enxofre e nitrogênio, liberados de usinas siderúrgicas, escapamentos de automóveis, fumaças domésticas, atividades vulcânicas, entre outros, combinam-se com moléculas de água, precipitando na forma de chuvas e neves ácidas. Além disso, há ainda uma contribuição por parte de efluentes industriais, das queimadas e da acidificação por processos naturais (WALKER et al., 1988; RODHE, 1989).

Animais frequentemente atingidos por esse problema são os peixes. O "European Inland Fisheries Advisory Commission" determinou como limite seguro para a sobrevivência de peixes em geral um pH entre 5 e 9 (DOUDOROFF e KATZ, 1950).

No ambiente aquático tem ocorrido índices além desses extremos, aos quais várias espécies foram submetidas, respondendo com diferentes graus de tolerância (DAYE e GARSIDE, 1975; DIVELY et al., 1977; FREDA e McDONALD, 1988; SCHOFIELD, 1994; ERIKSSON, 1994; PETERSON et al., 1989; BEAMISH, 1974; LIEN, 1994; GRAHAM e WOOD, 1981; DUNSON et al., 1977; MURTHY et al., 1981a,b). Dentre elas podemos citar a espécie *Micropterus dolomieu* (HILL et al., 1988) com limite inferior de tolerância letal em pH 5,5, e o *Gymnocorymbus ternetzi* (KAWALL, 1993) em pH 2,6.

Várias pesquisas buscaram caracterizar os efeitos das águas ácidas sob diferentes aspectos, tais como: na fisiologia da respiração (PLAYLE e WOOD, 1989; WIEBE et al., 1984; McDONALD, 1983; WALKER, et al., 1988; MURTHY et al., 1981a,b; LIN e RANDALL, 1990; HARGIS, 1976; FROMM, 1980; HEISLER, 1982; BUTLER et al., 1992); na bioquímica do sangue (LIEN, 1994; PACKER e DUNSON, 1969; DIVELY, et al., 1977; RASK e VIRTANEN, 1986; NEVILLE, 1979; SALAMA e NIKINMAA, 1988; GOSS e WOOD, 1988; THOMAS e HUGHES, 1982), na regulação iônica (BEAMISH, 1976; LEIVESTAD e MUNIZ, 1976; LOCKHART e LUTZ, 1977; AVELLAR, 1990; BATTRAM, 1988; SHEPHARD, 1992; WALSH et al., 1988; HOBE, 1987; PACKER e

DUNSON, 1969), nas respostas endócrinas (TAM et al., 1988; WHITEHEAD e BROWN, 1989; HONTELA et al., 1989), no metabolismo de carboidratos (MURTHY et al., 1981a, BHASKAR e GOVINDAPPA, 1985), na atividade enzimática (MURTHY et al., 1981b, TAM et al., 1988, BHASKAR e GOVINDAPPA, 1985) e na secreção celular (CAHON et al., 1987; ZUCHELKOWSKI et al., 1985; ULTSCH e GROSS, 1979; WESTFALL, 1945).

Outros aspectos também foram analisados como a influência da acidificação ambiental no crescimento (BEAMISH, 1976; FREDÁ e McDONALD, 1988; HILL et al., 1988; MENENDEZ, 1976), nos estágios de desenvolvimento (RASK, 1984; McCORMICK et al., 1989; LEINO et al., 1990 ) e no processo reprodutivo (BEAMISH, 1976; FROMM, 1980; LEINO et al., 1990).

Os efeitos histopatológicos causados por águas acidificadas foram evidenciados em estruturas como as brânquias (KARLSSON-NORRGREN et al., 1986; KAWALL, 1993; LEINO et al., 1987; LACROIX et al., 1990; CHEVALIER et al., 1985; LEINO e McCORMICK, 1990; JAGOE e HAINES, 1983; DAYE e GARSIDE, 1976; HILL et al., 1988; LEINO et al., 1990), pele (IGER e WENDELAAR BONGA, 1994; HILL et al., 1988), o fígado (KAWALL, 1993; KRÜGER, 1993), as gônadas (LEINO et al., 1990), rim (LEINO et al., 1990) e o sangue (HILL et al., 1988).

Respostas comportamentais frente à acidez da água foram evidenciadas nos níveis da atividade de natação (KAWALL, 1993; GRAHAM e WOOD, 1981; NELSON, 1989; NAKAMURA, 1986), na frequência respiratória (DIVELY et al., 1977; WALKER et al., 1988; KAWALL, 1993; CARLSON, 1984), na frequência de tosse (KAWALL, 1993; CARLSON, 1984), no comportamento alimentar (KAWALL, 1993; LEMLY e SMITH, 1987; HILL, 1989) e em respostas de alarme (SMITH e LAWRENCE, 1988; KAWALL, 1993).

Tecidos dos peixes vêm sendo utilizados na avaliação da poluição aquática, tanto por mercúrio quanto por águas acidificadas. Para o estudo do efeito de interação desses poluentes ambientais foi analisada a morfologia dos tecidos branquial e hepático. O tecido branquial foi escolhido por representar um sítio primário da ação tóxica de muitos poluentes que se encontram na água, devido à sua vulnerável localização externa e uma grande área de superfície ( MALLATT, 1985). O tecido hepático foi escolhido por estar envolvido em uma série de processos metabólicos vitais e, principalmente, por desempenhar importante papel na detoxificação (BAATRUP et al., 1986). Sabe-se que através do sangue que vem das brânquias (FILENKO et al., 1988) e pelo sangue venoso vindo do estômago e do intestino através da veia porta (HIBIYA, 1982), os tóxicos atingem o fígado e ali podem ser acumulados.

No Brasil, o aumento dos níveis de acidez da água vem sendo registrado em áreas de crescimento industrial, em grandes centros urbanos e outras regiões. Isto vem ocorrendo devido a disseminação atmosférica dos gases, oriundos não só das grandes cidades como também das queimadas que ocorrem na época da seca, bem como da submersão de regiões com mata como a consequência da construção de usinas hidrelétricas. Concomitantemente estimativas revelam o aumento da produção de ouro em áreas com novas frentes de garimpo. Tendo em vista estes fatos este trabalho tem por objetivo verificar de que maneira uma espécie de peixe nativa responde à interação de dois poluentes ambientais em níveis subletais do mercúrio inorgânico e águas acidificadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito histopatológico da interação de níveis subletais de mercúrio inorgânico com águas ácidas no peixe *Metynnis roosevelti*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis subletais de mercúrio inorgânico e de água acidificada para o peixe *Metynnis roosevelti*.

- Caracterizar a estrutura morfológica do tecido branquial e hepático sob as seguintes condições:

- normais
- de acidificação da água
- de contaminação com mercúrio inorgânico e
- de contaminação simultânea por mercúrio inorgânico e água acidificada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1-MATERIAL BIOLÓGICO

A espécie escolhida para o desenvolvimento deste trabalho foi *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915. Foi identificado sistematicamente de acordo com: GÉRY (1977), GÉRY e FRANCE (1979), STERBA (1959), MACHADO-ALLISON (1983), e confirmado por GIESSMANN (1994). Pertence à:

CLASSE: Osteichthyes

SUB-CLASSE: Actinopterygii

ORDEM: Cypriniformes

SUB-ORDEM: Cyprinoidea

FAMÍLIA: Characidae

SUB-FAMÍLIA: Serrasalminae

GÊNERO: *Metynnis*

ESPÉCIE: *Metynnis roosevelti*

A sub-família Serrasalminae é um grupo de peixes de água doce amplamente distribuído na América do Sul. Inclue treze gêneros, vários dos quais de importância comercial tais como: *Colossoma*, *Myleus*, *Mylossoma*, *Piaractus* e *Serrasalmus* (MACHADO-ALLISON, 1983).

Os representantes do gênero *Metynnis* são vulgarmente conhecidos como "pacu prata", diferindo dos outros Serrasalminae por terem nadadeira adiposa longa. Duas

espécies, *M. lippincottianus* e *M. lypsauchen*, são bastante comuns, enquanto que outras, como *M. maculatus*, *M. argenteus* e *M. mola*, são pouco conhecidas. De todas as espécies descritas *M. roosevelti* e *M. schreitmuelleri* são frequentemente citados em literatura, podendo ser sinônimos de *M. lippincottianus* e *M. lypsauchen*, respectivamente (GÉRY, 1977).

SEVERI (1991) caracteriza *Metynnis roosevelti* como uma espécie migradora, capaz de percorrer grandes distâncias, em numerosos cardumes, durante o período da reprodução. Segundo FOWLER, 1950 sua distribuição faz-se na Amazônia e Bolívia. Nas regiões sul e sudeste do Brasil vem sendo amplamente empregada em piscicultura.

GÉRY e FRANCE (1979) e MACHADO-ALLISON (1983) descrevem a espécie como animal de corpo alongado, usualmente achatado lateralmente na forma de disco, com cabeça relativamente pequena. No perfil ventral, entre a base das nadadeiras peitorais e o início da nadadeira anal, estão presentes as serras ventrais, pouco salientes e perceptíveis ao tato. Seu dorso, até a região da linha lateral tem coloração variando de cinza esverdeado a prateado. STERBA (1959) relata que os indivíduos desta espécie podem atingir até 14 cm. Seu hábito alimentar é marcadamente herbívoro, porém com ingestão de crustáceos e insetos quando houver oportunidade ou sempre que necessário (SEVERI, 1991).

Os exemplares de *M. roosevelti* (Fig.01) utilizados no experimento foram obtidos no comércio, procedentes de um criadouro do interior do estado de São Paulo.



FIGURA 1. Vista lateral do peixe *Metynnus roosevelti* (Eigenmann, 1915).

### 3.2-ACLIMATAÇÃO

Animais de comprimento total médio de 5,0 cm ( $\pm 1$ cm), foram mantidos em aquários de 128 L, com dimensões de 80x40x40 cm , em grupos de no máximo 20 indivíduos por aquário. A temperatura foi mantida a 27°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) , através de aquecedores acoplados a termostato eletrônico HW. O pH foi mantido em pH 7,0 ( $\pm 0,25$ ). Ambos fatores abióticos foram monitorados por eletrodos conectados a um aparelho Extech 695. A oxigenação da água foi mantida em níveis adequados através de compressores de ar. O fotoperíodo foi de 10 horas luz/14 horas escuro. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, logo após o início do período de luz e novamente ao término deste, com ração Vitormônio RCW.

Os aquários foram mantidos parcialmente fechados com tampas de vidro. Suas faces laterais e a posterior foram revestidas por papel "contact" verde escuro e a face anterior protegida por um anteparo, a uma distância que permitisse observação através de uma fenda central ( FANTA, 1995).

Alguns exemplares de *M. roosevelti* foram sacrificados após um período de aclimação mínimo de duas semanas, para estudo da morfologia branquial e hepática .

### 3.3- ARRANJO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1- DEFINIÇÃO DA FAIXA SUBLETAL PARA OS AGENTES TÓXICOS

Consistiu na determinação dos níveis subletais de acidez da água e da concentração subletal de mercúrio inorgânico para *M. roosevelti*. Cada um dos contaminantes foi avaliado separadamente pelo método do bioensaio.

##### 3.3.1.1- Acidificação da água

Os peixes foram mantidos em grupos de 10 indivíduos em aquários de 37,5 L , com dimensões de 50x30x25 cm, por duas semanas no mínimo, em condições idênticas às da aclimação, antes de ser dado o início ao experimento agudo de 96 horas de duração.

A acidificação da água foi obtida com ácido sulfúrico 0,1M da marca Nuclear. O ácido foi gotejado com auxílio de uma bureta, próximo ao borbulhador, para sua melhor dispersão. O pH foi reduzido gradativamente ao longo de 24 horas à média de 0,1

unidade/hora, até atingir o nível de pH 5,0. Foi monitorado continuamente por eletrodo através do aparelho Extech 695. O experimento agudo foi iniciado ao ser atingido o pH 5,0 que foi considerado como tempo inicial (To).

No decorrer do experimento agudo foram feitas observações comportamentais gerais com objetivo de serem detectados sintomas ou sinais de intoxicação como a alteração no comportamento alimentar, a perda de equilíbrio, secreção de muco, níveis de atividade ou mudanças nas atividades comportamentais padrão.

Foi feito o registro de mortes para cálculo dos índices de mortalidade e observado a existência de alguma evidência de sintomas comportamentais de intoxicação.

Ao término do experimento os peixes foram sacrificados após secção medular. Amostras do segundo arco branquial e do fígado foram fixadas em líquido de Bouin (CULLING et al, 1985), por 8 horas, para posterior avaliação através da Microscopia Óptica. A análise morfológica foi realizada em lâminas permanentes coradas com Hematoxilina e Eosina, afim de permitir o estudo de possíveis efeitos da acidificação a este nível de pH.

Concomitantemente ao experimento foi mantido um aquário controle, onde também foram feitas as coletas dos tecidos, para servirem como base comparativa para a análise dos efeitos da acidificação subletal.

#### 3.3.1.2-Contaminação por Mercúrio

Para determinação da concentração subletal de mercúrio inorgânico foram realizados três experimentos agudos. Os peixes utilizados nestes testes foram mantidos em grupos de dez indivíduos, previamente aclimatados, em aquários de 37,5 L.

No primeiro experimento agudo os peixes foram submetidos à concentração de 0,2 mgHg/L, concentração escolhida por ter sido empregada em uma outra espécie nativa (OLIVEIRA RIBEIRO, et al., 1995), mas houve a morte de todos os indivíduos. Após observação do efeito desta concentração na espécie em estudo, foram realizados o segundo e terceiro experimentos agudos com duração de 72 horas, nas concentrações de 0,1 mg Hg/L e 0,05 mgHg /L respectivamente.

A contaminação dos aquários foi efetuada a partir da diluição de uma solução estoque de 0,5 g de mercúrio inorgânico, sob a forma de cloreto de mercúrio da marca Reagen, em 500 ml de água destilada. A partir desta diluição fez-se uma segunda diluição nos aquários experimentais.

Foram feitas observações comportamentais gerais dos sintomas de intoxicação e registro de mortes para o cálculo dos índices de mortandade.

Ao término dos experimentos após secção medular dos animais, amostras do segundo arco branquial e do fígado foram fixadas em líquido de Bouin, (CULLING et al., 1985) por 8 horas, para posterior análise histológica, utilizando-se lâminas permanentes coradas com Hematoxilina e Eosina.

Simultaneamente ao teste para determinação da concentração subletal de mercúrio inorgânico, foi mantido um aquário controle. O segundo arco branquial e o fígado foram fixados em líquido de Bouin (CULLING et al., 1985) por 8 horas, servindo como base de comparação para as análises histológicas.

### 3.3.2- TESTE DOS AGENTES TÓXICOS ISOLADOS E EM CONJUNTO

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares de toxicidade, foram escolhidos o pH subletal 5,0 e a concentração subletal de mercúrio inorgânico de 0,1 mg Hg/ L, para serem utilizados no teste de interação de seus efeitos.

Para o estudo do efeito da interação de água ácida com o mercúrio inorgânico foram utilizados quatro aquários de 37,5 L cada um contendo 12 indivíduos, os quais permaneceram por no mínimo duas semanas em aclimação, sob condições controladas, como explicado no item aclimação. O aquário 1 foi estipulado como o grupo experimental contaminado com mercúrio e em pH 5,0 ( $\pm 0,2$ ) e os demais aquários como três tipos de controle: aquário 2: grupo experimental contaminado com mercúrio em pH neutro 7,15 ( $\pm 0,15$ ); aquário 3: grupo experimental ácido pH 5,0 ( $\pm 0,2$ ); aquário 4: grupo não contaminado em pH neutro 7,15 ( $\pm 0,15$ ).

Os aquário contaminados com mercúrio foram colocados no interior de uma capela de exaustão de gases por motivo de segurança e os outros dois foram mantidos em bancada de laboratório (Fig.2).

O pH e a temperatura dos aquários 1 e 2 foram monitorados por eletrodos através do aparelho Extech 695 e os Aquários 3 e 4 por eletrodos através do aparelho Ingold 206. Os aparelhos foram uniformemente calibrados, oferecendo resultado idênticos nas medições. A redução do pH dos aquários se deu no decorrer de 24 horas, à média de 0,1 unidade de pH por hora até ser atingido o nível de pH 5,0. Neste momento, considerado como  $T_0$ , foi feita a contaminação pelo mercúrio inorgânico em um dos aquários de água acidificada e em um dos aquários de pH neutro. O experimento realizado foi agudo, com duração de 96 horas. Dois peixes em cada aquário foram sacrificados, após secção medular, para retirada de amostras de brânquias e fígado nos seguintes tempos: 2, 4, 8, 24, 48 e 96h após o  $T_0$ .

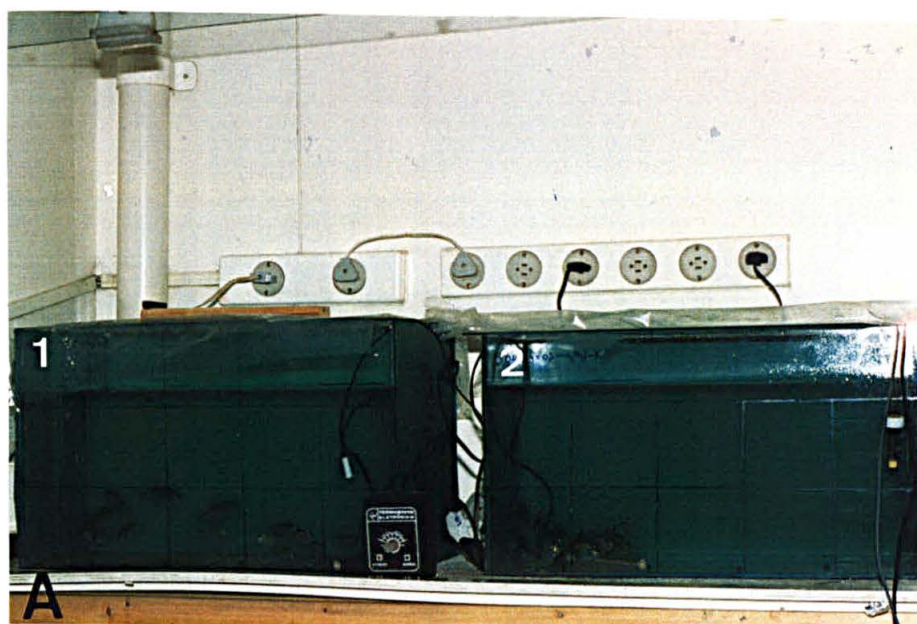


FIGURA 2. Vista geral do arranjo experimental para os testes dos agentes tóxicos isolados e em conjunto. **A.** aquário 1: grupo experimental contaminado com mercúrio em água acidificada a pH 5,0; aquário 2: grupo experimental contaminado apenas com mercúrio, **B.** aquário 3: grupo experimental em água acidificada em pH 5,0; aquário 4: grupo não contaminado; \* . anteparo usado em todos os aquários experimentais.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

Imediatamente após a secção medular dos animais, os opérculos eram levantados com auxílio de uma pinça e o fixador gotejado com pipeta de Pasteur diretamente sobre o tecido branquial.

Na cavidade opercular direita foi gotejado líquido de Bouin (CULLING et al., 1985) para futura análise histológica. A separação dos três primeiros arcos branquiais foi efetuada com auxílio de tesoura e pinça, sendo as amostras colocadas em vidros apropriados contendo o fixador. Na cavidade opercular esquerda, foi gotejado fixador para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para a investigação ultraestrutural superficial dos filamentos branquiais. Os três primeiros arcos branquiais foram removidos separadamente, colocados em placa plástica com o fixador Glutaraldeído 3.0 % em tampão cacodilato 0,2M, pH 7.2 na temperatura de 4°C (GLAUERT, 1986). As amostras foram colocadas em vidros apropriados contendo o fixador e armazenadas em geladeira à temperatura aproximada de 4°C.

Para extração do fígado foi feita uma incisão mediano ventral com auxílio de tesoura. Sobre o órgão foi gotejado o líquido de Bouin (CULLING et al., 1985) sendo o fígado em seguida retirado e colocado em vidro com o mesmo fixador para futuro processamento para Microscopia Óptica.

### 3.5 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Após o tempo de fixação de 8h, anteriormente determinado como ideal, para o segundo arco branquial e para o fígado, foi efetuada uma série de lavagens em álcool 70% para remoção do excesso de ácido pícrico. Os arcos branquiais foram mantidos em placas pequenas de Petri, embebidos em álcool 70% e sob lamínula por 24 horas. Este procedimento teve como objetivo o alinhamento dos filamentos branquiais, afim de proporcionar um melhor direcionamento dos cortes histológicos.

Os tecidos foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados com xileno, embebidos e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma) em blocos cúbicos. Os blocos foram trimados em forma piramidal e seccionados com lâminas descartáveis, em micrótomo Leitz, obtendo-se cortes de 2 a 4 $\mu$ m de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro, anteriormente preparadas com uma fina camada de Albumina de Mayer (CULLING, et al., 1985), sendo recobertos por uma fina camada de água destilada, esticados em placa aquecedora e secos à temperatura ambiente.

Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (CULLING et al., 1985) para realização da análise morfológica, dos tecidos hepático e branquial. As lâminas foram montadas com resina Poly-Mount® (Poly Sciences, Inc. ) e secas em temperatura ambiente.

As análises histológicas e as fotografias foram feitas em Fotomicroscópio Olympus PM 10AD do Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando-se filmes Kodakcolor 35mm, asa 100.

### 3.6 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após o tempo de fixação de 24 horas, as amostras do segundo arco branquial foram lavadas três vezes durante 5 minutos com água destilada, desidratadas em etanol 50% (duas vezes por 5 minutos) e etanol 70%, onde permaneceram a 4 °C. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol: 90%, 100% e 100% por 10 minutos em cada. O ponto crítico foi realizado no aparelho Balzers CPD010, a metalização no aparelho Balzers SCD 030 e as análises ultraestruturais no Microscópio Eletrônico SEM 505-PHILIPS do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

1. As soluções fixadoras e corantes estão descritos no apêndice 1.
2. O roteiro para processamento histológico de microscopia óptica segue no apêndice 2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS NORMAIS DA ESPÉCIE

#### 4.1.1 MORFOLOGIA

A análise morfológica permitiu a descrição estrutural das brânquias e do fígado do peixe *M. roosevelti*.

##### 4.1.1.1 Brânquias

As brânquias constituem-se de quatro pares de arcos branquiais alojados em ambos lados da faringe, na cavidade opercular, a qual comunica-se com o meio externo através de aberturas laterais recobertas por opérculos.

O tamanho dos arcos branquiais diminui gradativamente do primeiro par ao quarto par (Fig.3A). Cada arco branquial suporta duas fileiras de filamentos branquiais-as lamelas primárias (Fig.3B), que compõem a porção respiratória das brânquias.

As lamelas primárias são alongadas e possuem aproximadamente o mesmo diâmetro desde a inserção no arco branquial (porção basal) até a porção apical, possuindo cartilagem de sustentação ao longo de todo o seu comprimento (Fig.3C). Nas lamelas primárias inserem-se bilateralmente as lamelas secundárias, também conhecidas por lamelas respiratórias (Fig. 3C,D). As lamelas primárias são revestidas por células epiteliais que, em vista superficial, apresentam contorno poligonal sendo recobertas por microssaliências de disposição paralelas concêntricas. (Fig.3E).

As lamelas secundárias são as unidades funcionais das brânquias que, em vista superficial, apresentam formato foliáceo triangular com bordas externas arredondadas (Fig.4A). As lamelas secundárias da posição basal e apical dos filamentos branquiais apresentam-se menores do que as de posição intermediária. As lamelas secundárias são revestidas por um fino epitélio simples com células pavimentosas de contorno poligonal nítido e de superfície lisa. Abaixo deste epitélio observa-se uma rede intercomunicante de espaços sanguíneos delimitados por projeções citoplasmáticas de células denominadas células pilares. Pelos espaços sanguíneos circulam as hemácias nucleadas, características à classe dos peixes (Fig.4B).

#### 4.1.1.2 Fígado

O fígado do peixe *M. roosevelti* apresenta-se como uma glândula única. Suas células são conhecidas por hepatócitos, os quais apresentam formato poligonal com núcleo esférico central e geralmente de um a três nucléolos (Fig. 5A, B).

Os hepatócitos desta espécie apresentam arranjo em cordões aleatoriamente dispostos em todo o tecido.

Observa-se ainda a presença de canálculos biliares e de vasos sanguíneos com hemácias nucleadas (Fig.5B).

#### 4.1.2 COMPORTAMENTO

A análise descritiva do comportamento do peixe *M. roosevelti* revelou que no período luminoso, em que foram realizadas as observações, esta espécie apresenta grande atividade natatória. A natação faz-se preferencialmente na meia água ao longo do maior

comprimento do aquário. A maioria dos peixes nadam agregadamente e em sincronismo, com a exceção de alguns indivíduos não seguem este padrão de comportamento.

Os peixes se alimentavam na superfície da água e/ou na meia água e, durante este período, cessavam a atividade natatória. Os movimentos das nadadeiras para a manutenção da posição mais adequada para captura do alimento eram curtos e rápidos, resultando em deslocamento em sua direção. Os peixes também se alimentavam espontaneamente em outros horários que não os de oferta de alimento, abocanhando aquele depositado no fundo do aquário. Para isto, permaneciam com o corpo inclinado lateralmente, mantendo-o nesta posição através dos movimentos de suas nadadeiras, inclinando em seguida a região da boca em direção ao assoalho do aquário para abocanhar o alimento.

Quando os peixes eram introduzidos em um aquário ou transferidos, observava-se a reação de alarme. Esta caracterizava-se por uma natação bastante intensa com a apresentação de uma postura onde a extremidade bucal anterior e ventral do animal apoiava-se no assoalho do aquário e o corpo mantinha-se inclinado a um ângulo de aproximadamente 60° em relação a este. Após o reconhecimento do ambiente os peixes iniciavam seu padrão de atividade natatória com postura normal.

Comportamentos territorialista e agressivo não foram observados nas condições de aclimação às quais os animais foram submetidos.

## 4.2 DEFINIÇÃO DA FAIXA SUBLETAL PARA OS AGENTES TÓXICOS

Para definição da faixa subletal para o nível de acidez da água partiu-se do ponto de referência à pH 5,0. Na determinação da concentração subletal de mercúrio inorgânico para a espécie em estudo, partiu-se da concentração de 0,2 mgHg/L.

### 4.2.1 ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA

#### 4.2.1.1 Mortalidade

Não foram registrados casos de mortalidade em peixes controle ou nos expostos ao pH 5,0. Este nível foi portanto, subletal para a espécie *M. roosevelti*.

#### 4.2.1.2 Comportamento

O comportamento geral dos peixes experimentais não foi diferente do dos peixes controle. Portanto não apresentaram sintomas de toxicidade.

#### 4.2.1.3 Histopatologia

Brânquia: A análise do tecido branquial a nível de microscopia óptica revelou o discreto enrugamento do epitélio lamelar e degeneração celular tanto nas lamelas primárias como nas secundárias. Observa-se a presença de núcleos picnóticos na lamela primária e maior concentração de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemácias (Fig.6A ).

Fígado: O tecido hepático de uma forma geral apresentou-se desorganizado quando comparado ao controle. Evidenciou-se núcleos picnóticos, degeneração celular e grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos ( Fig.6B).

#### 4.2.2 CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO

##### 4.2.2.1 Mortalidade

À concentração de 0,2 mgHg/L todos os peixes morreram em um período estimado de aproximadamente 15 horas de exposição, portanto a concentração de 0,2 mgHg/L foi letal para a espécie *M. roosevelti*. Não houve casos de mortalidade de peixes controle.

À concentração de 0,1 mgHg/L e de 0,05 mgHg/L não houve casos de mortalidade nos peixes expostos ao mercúrio inorgânico. Não houve casos de mortalidade dos peixes controle.

##### 4.2.2.2 Comportamento

Tanto na concentração de 0,05 mgHg/ L como na de 0,1 mgHg/L foram observados os seguintes sintomas de toxicidade: diminuição da atividade natatória, aumento da secreção de muco principalmente na concentração mais elevada de mercúrio, chegando a causar turbidez da água e dificultando o manuseio dos peixes que ficaram com o corpo escorregadio.

#### 4.2.2.3. Histopatologia

Brânquia: À concentração de 0,1 mgHg/L o tecido branquial apresentou mudanças estruturais quando comparado ao dos peixes controle. Observou-se degeneração e necrose celular e o enrugamento epitelial. As células pilares revelam-se hipertrofiadas e as lamelas secundárias assumiram um aspecto inchado. Nas mesmas verificou-se também hiperplasia, espaços sanguíneos pouco nítidos e aumento de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemácias (Fig. 6C.).

Na concentração de 0,05 mgHg/L o tecido epitelial não apresentou alterações morfológicas tão intensas como as apresentadas à concentração de 0,1 mgHg/L. As alterações observadas foram separação do epitélio lamelar com formação de edema, discreta degeneração celular, leve enrugamento epitelial e aumento no número de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemácias ( Fig.6D).

Fígado: À concentração de 0,1 mgHg/L o tecido hepático como um todo mostrou-se desorganizado quando comparado ao controle. Os hepatócitos apresentaram-se hipertrofiados, caracterizando o inchaço tecidual, com vacuolização citoplasmática e intensa degeneração celular. Observaram-se núcleos picnóticos e em algumas regiões o núcleo não foi mais observado indicando necrose celular. Também foram evidenciados grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos ( Fig.6E).

À concentração de 0,05 mgHg/L o tecido hepático mostrou-se com alterações menos intensas. As alterações encontradas foram: núcleos picnóticos, degeneração celular e a presença de grânulos pardos grandes no citoplasma dos hepatócitos ( Fig.6F).

### 4.3 EFEITO DOS AGENTES TÓXICOS EM NÍVEL SUBLETAL

Para ser feita a avaliação do efeito da interação da acidez da água com o mercúrio inorgânico, tomou-se como base os resultados obtidos com os agentes tóxicos separadamente. Assim para o efeito de águas ácidas utilizou-se o pH 5,0 e para o mercúrio inorgânico a concentração de 0,1 mgHg/L, ambos subletais conforme determinação no teste preliminar de toxicidade.

#### 4.3.1 EFEITO ISOLADO DA ÁGUA ACIDIFICADA a pH 5

##### 4.3.1.1 Histopatologia da Brânquia

Tempo de exposição de 2 horas: Ao microscópio óptico, o epitélio das lamelas secundárias apresentou-se levemente enrugado. Algumas hemácias apresentaram-se em processo de degeneração celular e com o aparecimento de grânulos eosinofílicos citoplasmáticos. Observaram-se algumas células em processo de degeneração e necrose lamelas primárias (Fig. 7A). Superficialmente verificou-se que houve discreta diminuição das microsaliências na superfície das células epiteliais em alguns focos das lamelas primárias (Fig. 7B).

Tempo de exposição de 4 horas: O nível de enrugamento do epitélio lamelar apresentou-se acentuado em algumas regiões focais do tecido branquial. Observou-se a constrição dos espaços sanguíneos, a degeneração celular principalmente das hemácias e uma modificação no formato das células epiteliais lamelares e de seus núcleos que se

apresentam cubóides. Na região interlamelar verificou-se desorganização do epitélio com focos de necrose (Fig.7C). À MEV as células epiteliais das lamelas primárias apresentaram diminuição das microssaliências na região central de cada célula (Fig.7D).

Tempo de exposição de 8 horas: Neste tempo de exposição observou-se a diminuição do enrugamento epitelial e da constrição dos espaços sanguíneos em relação ao tempo anterior, mas houve o aumento generalizado da espessura das lamelas. A degeneração celular persistiu e acentuou-se nas lamelas primárias e secundárias (Fig.7E). Na MEV observamos a diminuição das microssaliências a um nível mais acentuado que no tempo de exposição anterior (Fig.7F) e pontos de ruptura no epitélio da porção apical das lamelas primárias (Fig.8A).

Tempo de exposição de 24 horas: Neste tempo de exposição foi observado o enrugamento epitelial, porém não tão acentuado quanto ao tempo de exposição de 4 horas. Observou-se discreta hiperplasia no epitélio lamelar e degeneração celular nas lamelas primárias e secundárias (Fig.8B). Ao MEV observou-se intensa diminuição das microssaliências das células epiteliais das lamelas primárias (Fig.8C).

Tempo de exposição 48 horas: O enrugamento epitelial, a este tempo de exposição, mostrou-se discreto. Observaram-se focos com discreta hiperplasia no epitélio lamelar, células com núcleos de diversos tamanhos e densidades e em processo de degeneração celular (Fig.8D). À nível de MEV observou-se o menor grau de alteração nas microssaliências, em relação ao tempo anterior. (Fig.8E).

Tempo de exposição de 96 horas: Neste tempo de exposição os focos de hiperplasia não são mais evidenciados. O epitélio lamelar apresentou nível de enrugamento semelhante ao de 2 horas de exposição. Observou-se nas hemácias a presença de grânulos eosinofílicos e nas lamelas primárias núcleos picnóticos e de algumas células em degeneração celular (Fig.9A). A nível de MEV observou-se uma recuperação na disposição das microssaliências (Fig.9B).

#### 4.3.1.2 Histopatologia do Fígado

Tempo de exposição de 2 horas: A este tempo de exposição o tecido hepático apresentou-se, de uma forma geral, com sua morfologia alterada. Os hepatócitos apresentaram vacuolização citoplasmática, núcleos picnóticos e células em processo de degeneração (Fig.9C).

Tempo de exposição de 4 horas: O tecido como um todo apresentou-se com alterações mais intensas nas regiões próximas aos vasos sanguíneos onde foram encontrados focos de necrose celular. No tecido observaram-se núcleos picnóticos, núcleos com formatos variáveis, alguns totalmente degenerados, hemácias de formato irregular e a presença de grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (Fig.9D).

Tempo de exposição de 8 horas: O aspecto geral do tecido assemelhou-se ao tempo de exposição anterior. Houve focos de células com núcleos íntegros e ativos. (Fig.9E).

Tempo de exposição de 24 horas: Neste tempo de exposição a degeneração celular não foi tão marcante quanto nos tempos anteriores de exposição. Evidenciaram-se alguns

núcleos picnóticos, vários em diferentes fases de degeneração mas também muitos íntegros e a presença de grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (Fig. 9F).

Tempo de exposição de 48 horas: Observou-se no tecido hepático a presença de núcleos picnóticos, de núcleos com formatos irregulares, em diferentes graus de degeneração, estando outros íntegros. Grânulos amarelo-marrons foram observados no citoplasma dos hepatócitos (Fig.10A).

Tempo de exposição de 96 horas: O aspecto geral do tecido hepático mostrou-se com maior grau de desorganização quando comparado com os tecidos dos anteriores tempos de exposição. Ocorreu o aumento da intensidade de células em diferentes graus de degeneração celular, o tecido hepático apresentou-se com aspecto inchado, verificou-se a presença de alguns núcleos picnóticos e de grânulos amarelo-marrons (Fig.10B).

#### 4.3.2 EFEITO ISOLADO DA CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO À 0,1 mg Hg/l

##### 4.3.2.1 Histopatologia da Brânquia

Tempo de 2 horas de exposição: Neste tempo as lamelas respiratórias apresentaram-se estreitadas e com o epitélio lamelar ligeiramente enrugado. As hemácias apresentaram grânulos eosinofílicos citoplasmáticos e degeneração celular. Nas lamelas primárias observaram-se núcleos picnóticos e a degeneração celular (Fig.10C). Ao nível da superfície das células epiteliais das lamelas primárias, o tecido apresentou algumas células com diminuição de suas microssaliências (Fig.10D).

Tempo de exposição de 4 horas: De uma forma geral todo o tecido epitelial apresentou-se alterado nas lamelas secundárias. Ao Microscópio Óptico (MO), visualizou-se a separação do epitélio lamelar com formação de edema, enrugamento das células epiteliais, núcleos picnóticos e irregulares, necrose celular e degeneração celular acentuada nas hemácias (Fig. 10E). Ao MEV observou-se a diminuição das microssaliências na região central das células epiteliais das lamelas primárias (Fig. 10F).

Tempo de exposição de 8 horas: De uma forma geral ocorreu a diminuição da separação do epitélio das lamelas respiratórias, porém apresentou-se mais enrugado. Observam-se núcleos picnóticos, degeneração celular e a presença de grânulos eosinofílicos nas hemácias (Fig. 11A). A MEV revela a disposição das microssaliências semelhante às do controle (Fig. 11B).

Tempo de exposição de 24 horas: Nas lamelas secundárias ocorre o enrugamento do epitélio lamelar e a constricção dos espaços sanguíneos com congestão sangüínea. Verifica-se a presença de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemácias e a degeneração celular. (Fig. 11C). Através da MEV observa-se a diminuição das microssaliências, principalmente nas regiões próximas às lamelas secundárias (Fig. 11D).

Tempo de exposição de 48 horas: Neste tempo de exposição observa-se o aspecto inchado das lamelas secundárias. Visualiza-se o epitélio lamelar levemente enrugado e a degeneração e necrose celular (Fig. 11E). A nível de MEV o epitélio apresenta-se íntegro, com discreta diminuição das microssaliências (Fig. 11F).

Tempo de exposição de 96 horas: As lamelas secundárias apresentam-se extremamente alteradas. O epitélio lamelar apresenta-se enrugado, com focos de hiperplasia, degeneração celular e os espaços sanguíneos não se apresentam nítidos. Observa-se nas lamelas primárias a degeneração celular, núcleos picnóticos, e necrose celular (Fig.12A). Em vista superficial das lamelas primárias observam-se poucas células epiteliais com a diminuição de suas microssaliências (Fig.12B). Também observam-se pontos de ruptura epitelial nas porções apicais (Fig.12C).

#### 4.3.2.3 Histopatologia do Fígado

Tempo de exposição de 2 horas: De uma forma geral, o tecido hepático, neste tempo de exposição, apresentou-se com maior grau de desorganização na proximidade dos vasos sanguíneos, onde verificou-se necrose celular. Alguns hepatócitos apresentaram degeneração celular e núcleos picnóticos (Fig.12D).

Tempo de exposição de 4 horas: O tecido de uma forma geral apresentou-se alterado. Observou-se a grande quantidade de grânulos amarelo-marrons espalhados por todo tecido hepático. Algumas células hepáticas apresentaram núcleos picnóticos e outras em degeneração. Foi observada necrose celular focal (Fig.12E).

Tempo de exposição de 8 horas: O tecido hepático apresentou-se morfológicamente melhor organizado quando comparando com os de tempos de exposição anteriores. Verificaram-se células com núcleos picnóticos e com degeneração celular focal (Fig.13A).

Tempo de exposição de 24 horas: O efeito do mercúrio neste tempo de exposição refletiu-se com a mesma intensidade do tempo anterior (Fig. 13B).

Tempo de exposição de 48 horas: O tecido apresentou um aumento na degeneração celular. Visualizaram-se hemácias de formato irregular e com grânulos eosinofílicos em seus citoplasmas. Observou-se a vacuolização citoplasmática, núcleos picnóticos e a presença de grânulos amarelo-marrons (Fig. 13C).

Tempo de exposição de 96 horas: Neste período de exposição, as células do tecido hepático, apresentaram-se inchadas. Observou-se a presença dos grânulos amarelo-marrons, núcleos picnóticos e de hemácias de formato irregular. Ocorreu ainda a degeneração celular e a vacuolização citoplasmática (Fig. 13D).

#### 4.3.3 EFEITO DA AÇÃO INTEGRADA DO MERCÚRIO À 0,1mgHg/L E DA ÁGUA ACIDIFICADA À pH 5

##### 4.3.3.1 Histopatologia da Brânquia

Tempo de exposição de 2 horas: As lamelas respiratórias apresentaram constricção dos espaços sanguíneos e enrugamento epitelial. Observou-se degeneração celular, núcleos picnóticos e a presença de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemácias (Fig. 13E). A MEV revelou a diminuição das microssaliências em algumas células epiteliais das lamelas primárias (Fig. 13F).

Tempo de exposição de 4 horas: A este tempo de exposição, o epitélio lamelar apresentou-se mais enrugado que ao tempo de exposição anterior. Nas lamelas primárias observou-se degeneração celular e núcleos picnóticos (Fig.14A). A nível de MEV observou-se o agravamento da diminuição das microssaliências das células epiteliais das lamelas primárias, principalmente na proximidade das lamelas secundárias (Fig.14B).

Tempo de exposição de 8 horas: O nível de enrugamento epitelial apresentou-se maior que o do tempo anterior de exposição. Nas lamelas respiratórias verificou-se a congestão sanguínea, além de hemácias em degeneração celular e com grânulos eosinofílicos em seus citoplasmas. Nas lamelas primárias observaram-se núcleos picnóticos (Fig.14C). A nível de MEV observou-se, de uma forma geral, o desaparecimento das microssaliências das células epiteliais em toda a extensão das lamelas primárias (Fig.14D).

Tempo de exposição de 24 horas: Neste tempo de exposição, verificou-se a separação do epitélio lamelar. Algumas hemácias apresentaram-se degeneradas e outras alteradas em sua forma e tamanho e com grânulos eosinofílicos em seus citoplasmas. No epitélio das lamelas secundárias observaram-se núcleos picnóticos e nas lamelas primárias observaram-se regiões em degeneração celular e necrose celular (Fig.14E). A nível de MEV, algumas células das lamelas primárias apresentaram a diminuição das microssaliências e alteração em sua disposição (Fig.14F).

Tempo de exposição de 48 horas: A separação do epitélio das lamelas respiratórias persistiu. Verificou-se a degeneração celular intensificada nas hemácias e a presença de

núcleos picnóticos (Fig.15A). A nível de MEV verificou-se a diminuição das microssaliências em toda área da superfície celular (Fig.15B).

Tempo de exposição de 96 horas: Observou-se quase completa degeneração das lamelas secundárias com necrose tanto das células epiteliais como das células pilares. Assim, os espaços sangüíneos apresentaram-se com pouca nitidez e com uma maior quantidade de hemácias parcialmente degeneradas. Observou-se a presença de células necrosadas no tecido das lamelas primárias (Fig.15C), provavelmente correspondendo às rupturas vistas através da MEV em toda a extensão do epitélio das lamelas primárias (Fig.15D), as quais não foram observadas após 48 horas de exposição (Fig.15E). Observou-se, também alteração na disposição e diminuição das microssaliências das lamelas primárias (Fig.15F).

#### 4.3.3.2 Histopatologia do Fígado

Tempo de exposição de 2 horas: Neste tempo de exposição, o tecido hepático de uma forma geral apresentou-se praticamente inalterado. Visualizaram-se núcleos picnóticos e algumas células em degeneração celular (Fig.16A).

Tempo de exposição de 4 horas: Observou-se desorganização tecidual sendo que alguns hepatócitos apresentam seus núcleos picnóticos e estavam em processo de degeneração. Os grânulos amarelo-marrons foram visualizados em todo o tecido hepático (Fig.16B).

Tempo de exposição de 8 horas: A partir deste tempo de exposição o tecido apresentou poucas células com seus citoplasmas vacuolizados, células em degeneração celular, núcleos picnóticos e inchaço celular (Fig. 16C).

Tempo de exposição de 24 horas: O tecido hepático apresentou vacuolização citoplasmática mais acentuada que a apresentada às 8 horas. O tecido exibiu regiões com degeneração celular, núcleos picnóticos e a presença dos grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (Fig. 16D).

Tempo de exposição de 48 horas: Neste tempo de exposição o tecido exibiu aumento da vacuolização citoplasmática. Observou-se o inchaço celular, a presença de núcleos picnóticos e de grânulos pardos. A degeneração celular apresentou-se acentuada em relação aos tempos de exposição anteriores (Fig. 16E).

Tempo de exposição de 96 horas: O tecido hepático, de uma forma geral, apresentou alto grau de vacuolização citoplasmática e inchaço celular. Alguns núcleos apresentaram-se em processo de degeneração celular intensificado em todo tecido hepático. Os grânulos pardos eram grandes, com tamanho igual ou superior ao do núcleo (Fig. 16F).

Nas tabelas 1 e 2 é apresentada um resumo das principais alterações morfológicas observadas nos tecidos branquial e hepático respectivamente, frente à exposição em águas ácidas, ao mercúrio e ao mercúrio em ambiente ácido.

Tabela 1 - Alterações morfológicas no tecido branquial associadas com os agentes tóxicos administrados via água no peixe *M. roosevelti*. P, presente; (\_h), horário de maior intensidade; +, efeito mais intenso; -, ausente.

<i>Alteração morfológica</i>	<i>ÁCIDO</i>	<i>MERCÚRIO</i>	<i>MERCÚRIO+ÁCIDO</i>
<b>Separação do epitélio lamelar</b>	-	P(4h)	P+(24h)
<b>Enrugamento epitelial</b>	P+(4h)	P(8h)	P(8h)
<b>Hiperplasia</b>	P(48h)	P+(96h)	-
<b>Núcleos picnóticos</b>	P	P	P
<b>Grânulos eosinofílicos</b>	P	P	P
<b>Degeneração celular</b>	P+(8h)	P(4h)	P(96h)
<b>Diminuição das microssaliências</b>	P+(24h)	P(4h)	P++(8h)
<b>Ruptura epitelial</b>	P(24h)	P+(96h)	P++(96h)
<b>Congestão sangüínea</b>	-	P(24h)	P+(8h)

Tabela 2- Alterações morfológicas no tecido hepático associadas com os agentes tóxicos administrados via água no peixe *M. roosevelti*. P, presente; (\_h), horário de maior intensidade; + efeito mais intenso.

<i>Alteração morfológica</i>	<i>ÁCIDO</i>	<i>MERCÚRIO</i>	<i>MERCÚRIO+ÁCIDO</i>
<b>Vacuolização citoplasmática</b>	P (2h)	P(96h)	P+(96h)
<b>Inchaço celular</b>	P+(96h)	P(96h)	P++(96h)
<b>Grânulos amarelo-marrons/pardos</b>	P(96h)	P+(4h)	P++(96h)
<b>Grânulos eosinofílicos</b>	P	P	P
<b>Núcleos picnóticos</b>	P	P	P
<b>Degeneração celular</b>	p +( 96h)	p ( 4h )	p++( 96 h )

### FIGURA 3

**A.** Arcos branquiais direitos dissecados e fixados em fluido de Bouin, mostrando a diminuição gradativa do tamanho do primeiro ao quarto arco branquial. Primeiro arco branquial (I), segundo arco branquial (II), terceiro arco branquial (III) e quarto arco branquial (IV). (Escala 2mm).

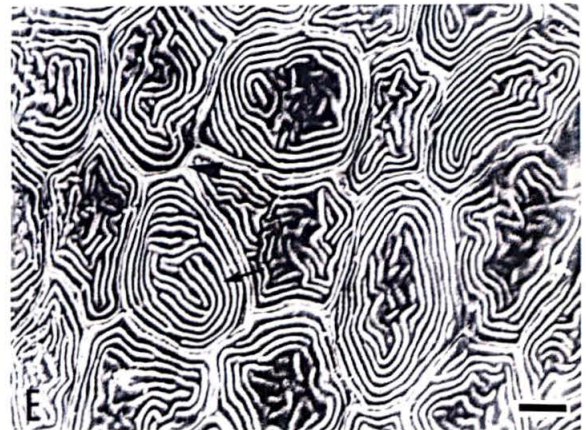
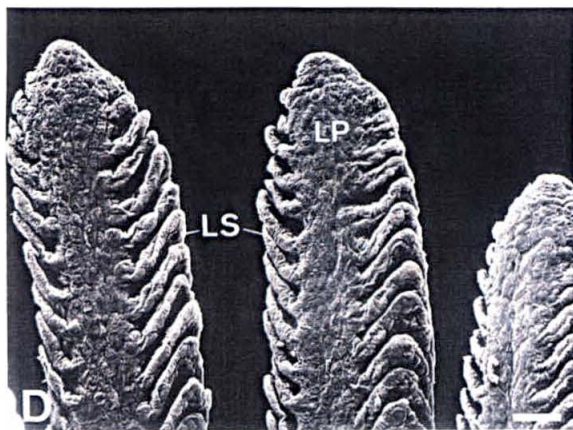
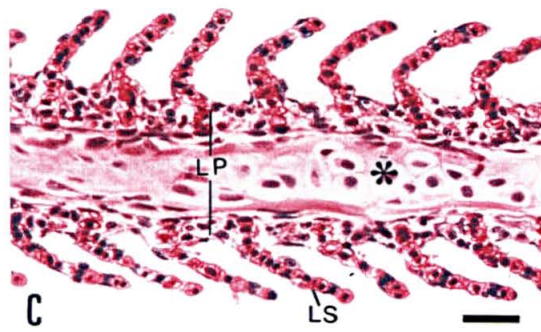
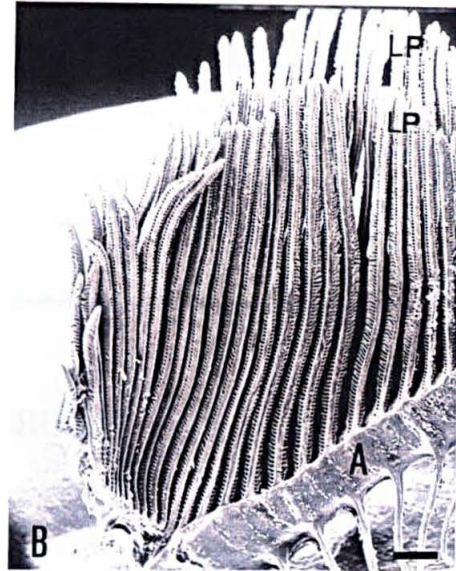
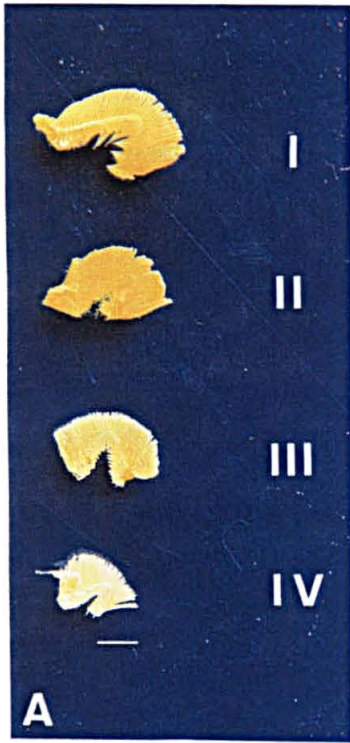
**B.** Vista superficial da estrutura branquial mostrando a distribuição no arco branquial (**A**) de duas fileiras de lamelas primárias (**LP**). (MEV. 32x - escala 250µm).

**C.** Secção longitudinal das lamelas branquiais. Observar a cartilagem (**\***) ao longo do comprimento da lamela primária (**LP**) e a inserção bilateral das lamelas secundárias (**LS**). (HE 400x - escala 20µm).

**D.** Visão superficial da porção terminal das lamelas primárias. Observar o comprimento variável das lamelas primárias (**LP**) e a inserção bilateral das lamelas secundárias (**LS**). (MEV 351x - escala 25µm).

**E.** Vista superficial do epitélio das lamelas primárias. Observar o contorno poligonal das células do epitélio do epitélio (**▼**) e a disposição paralelo concêntrica das microssaliências (**↑**). (MEV 3687x - escala 2,5µm)

FIGURA 3

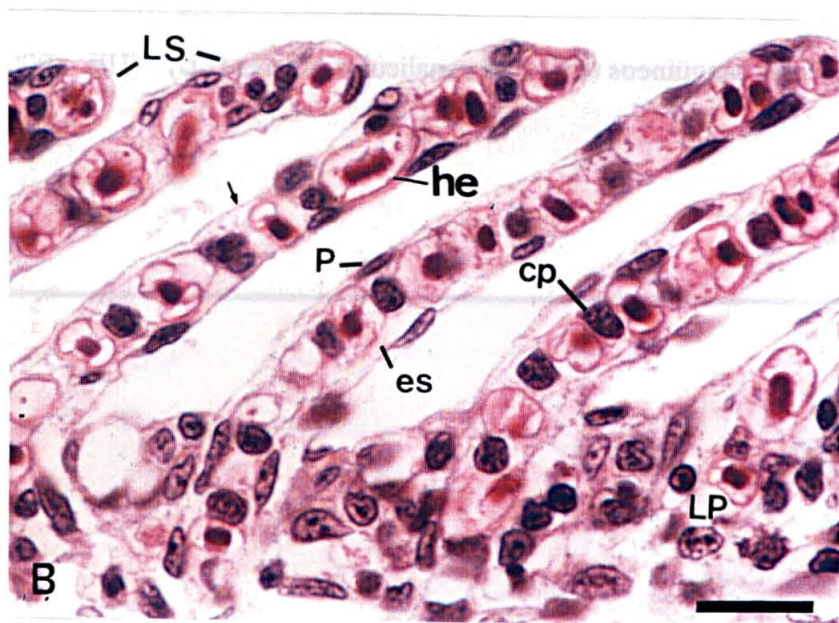


## FIGURA 4

A. Vista superficial das lamelas secundárias. Observar o formato foliáceo triangular (▲) e bordas arredondadas (\*). (MEV 1484x - escala 10µm)

B. Secção longitudinal das lamelas primárias. Em detalhe: lamela primária (LP) com a inserção das lamelas secundárias (LS): epitélio da lamela secundária (↑), célula pavimentosa (P), espaços sangüíneos (es) com hemáceas nucleadas (he) e célula pilar (cp). (HE 1000x - escala 10µm).

FIGURA 4

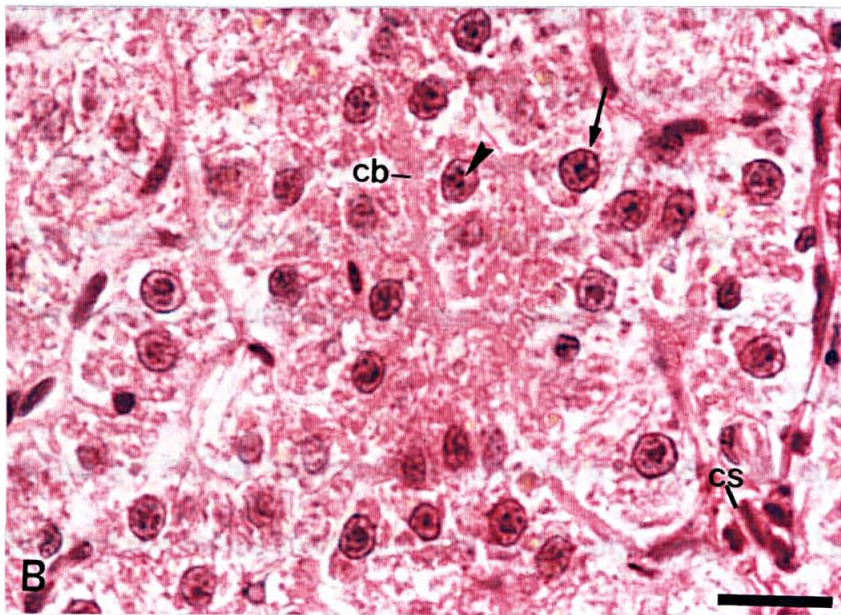
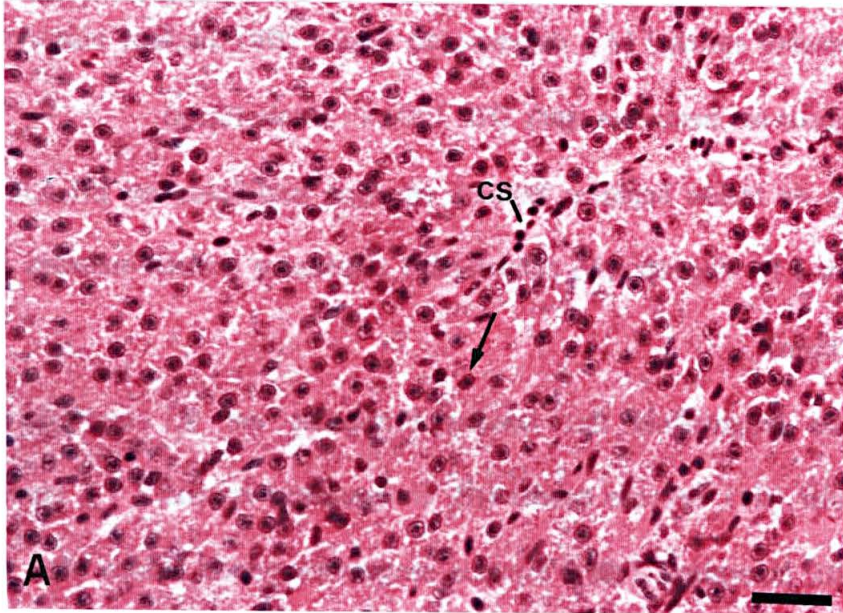


## FIGURA 5

**A.** Secção do tecido hepático. Observar os hepatócitos com disposição cordonal aleatória. Núcleo dos hepatócitos (↑) e os capilares sanguíneos (**cs**). (HE 400x - escala 20µm).

**B.** Secção do tecido hepático. Observar os hepatócitos com núcleo central (↑) e nucléolos (▼), capilares sanguíneos (**cs**) e os canaliculos biliares (**cb**). (HE 1000x - escala 10 µm).

FIGURA 5



## FIGURA 6

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada a pH 5,0. Observar enrugamento epitelial (↑), degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼) e grânulos eosinófilicos nas hemáceas (**ge**). (HE 1000 x - escala 10µm).

B. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada em pH 5,0. Observar núcleos picnóticos (▼), degeneração celular (**dc**) e grânulos amarelo-marrons (**ga**). (HE 1000 x - escala 10µm).

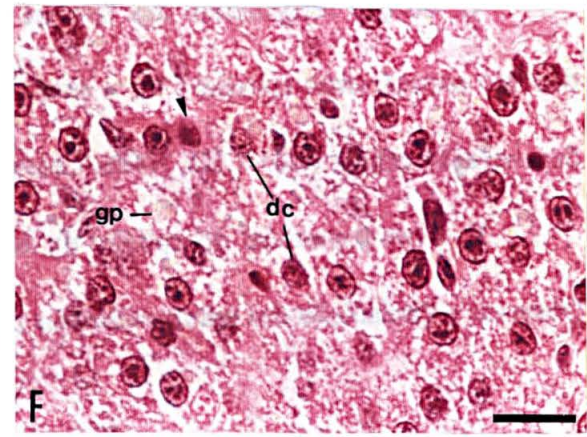
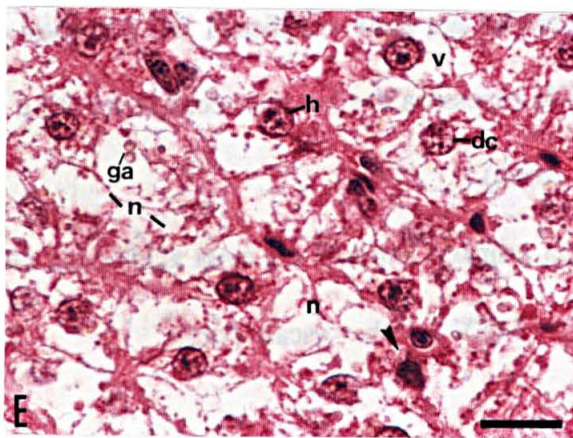
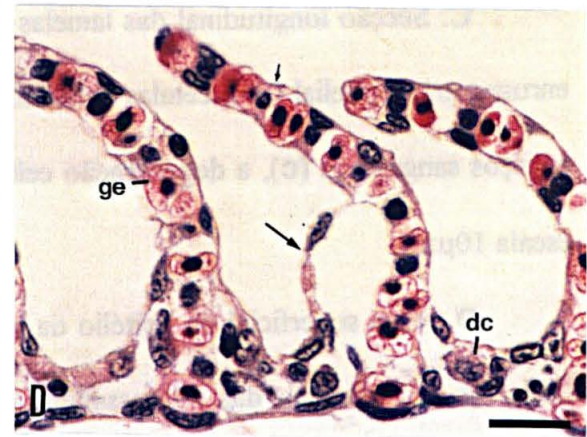
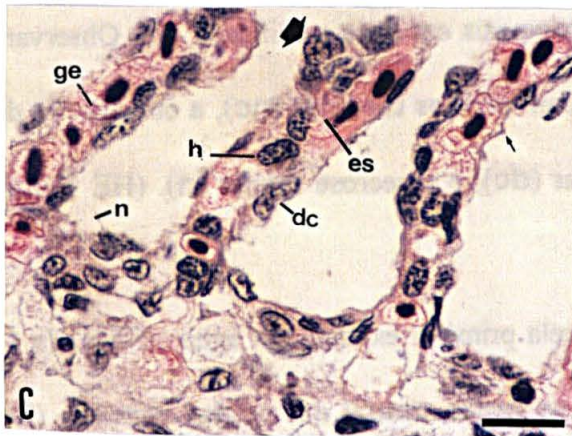
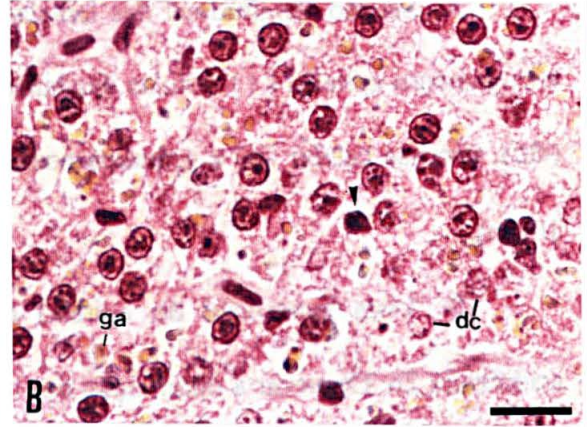
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em 0,1 mgHg/L. Observar degeneração celular (**dc**), necrose celular (**n**), enrugamento epitelial (↑), hipertrofia das células pilares (**h**), hiperplasia (⬆), espaços sanguíneos pouco nítidos (**es**) e grânulos eosinofílicos (**ge**). (HE 1000 x - escala 10µm).

D. Secção longitudinal das lamelas branquiais em 0,05 mg Hg/L. Observar separação do epitélio lamelar (↑), degeneração celular (**dc**), enrugamento epitelial (↑) e grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**). (HE 1000 X escala 10µm).

E. Secção do tecido hepático exposto a concentração de 0,1 mg Hg/L . Observar hipertrofia celular (**h**), vacuolização citoplasmática (**v**), degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼), necrose celular (**n**) e grânulos amarelos-marrons nos hepatócitos (**ga**). (HE 1000x - escala 10µm).

F. Secção do tecido hepático exposto a concentração de 0,05 mg Hg/L. Observar núcleos picnóticos (▼), degeneração celular (**dc**) e grânulos pardos nos hepatócitos (**gp**). (HE 1000x - escala 10µm).

FIGURA 6



## FIGURA 7

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 2h. Observar o enrugamento epitelial (↑), células das lamelas primárias e hemáceas em degeneração celular (**dc**), necrose celular (**n**) e grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**). (HE 1000x - escala 10µm).

B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição em água acidificada 2h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais (**Di**). (MEV 2.802x - escala 5µm).

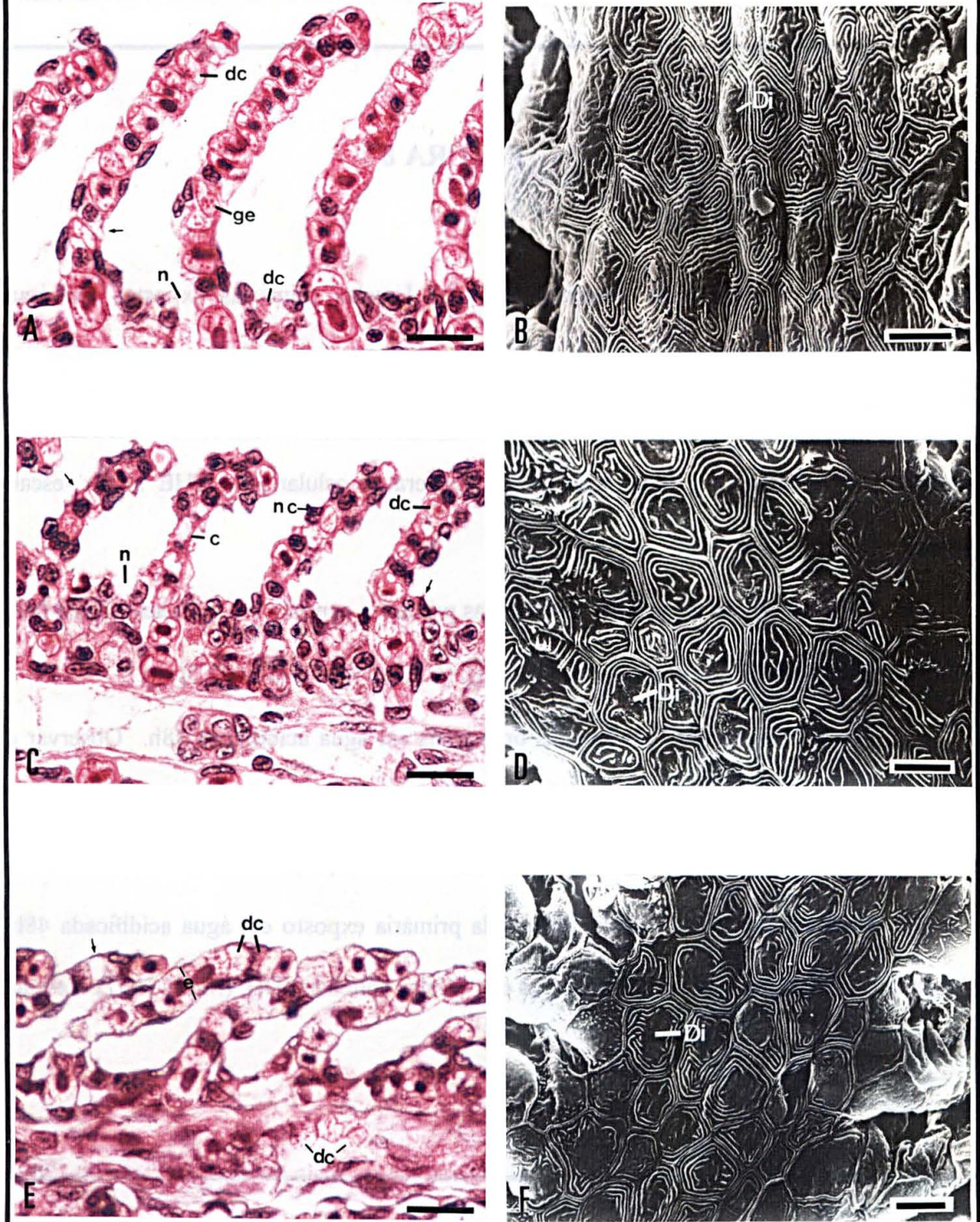
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 4h. Observar o enrugamento epitelial (↑), células epiteliais com núcleos cubóides (**nc**), a constrição dos espaços sanguíneos (**c**), a degeneração celular (**dc**), e a necrose celular (**n**). (HE 1000x - escala 10µm).

D. Vista superficial do epitélio da lamela primária exposta em água acidificada 4h. Observar a diminuição das microssaliências na região central das células epiteliais (**Di**). (MEV 2.700x - escala 5µm).

E. Secção longitudinal das lamelas primárias em água acidificada 8h. Observar o discreto enrugamento epitelial (↑), o aumento da espessura das lamelas secundárias (**e**) e a degeneração celular (**dc**). (HE 1000x - escala 10µm).

F. Vista superficial do epitélio da lamela primária exposto em água acidificada 8h. Observar a diminuição das microssaliências (**Di**). (MEV 2.164x - escala 5µm).

FIGURA 7



## FIGURA 8

A. Vista superficial da porção apical das lamelas primárias expostas em água acidificada 8h. Observar a ruptura epitelial (↑). (MEV 351x - escala 25µm).

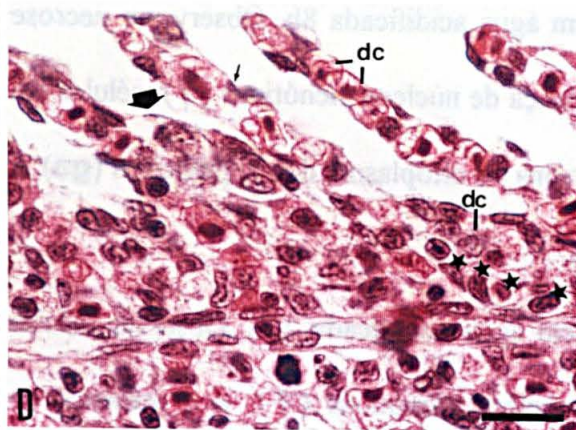
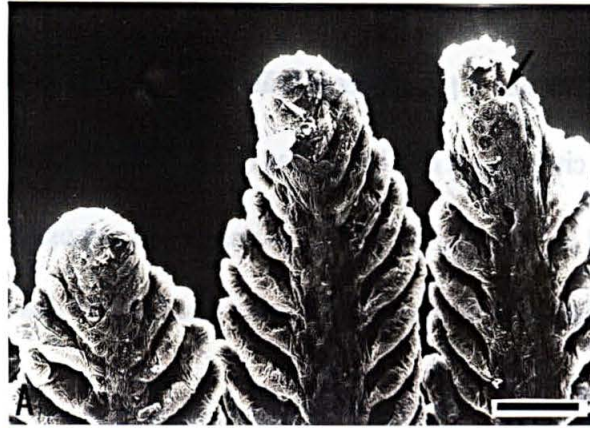
B. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 24h. Observar o enrugamento epitelial (↑), hiperplasia (▲), degeneração celular (dc). (HE 1000x -escala 10µm).

C. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias exposto em água acidificada 24h. Observar a diminuição das microssaliências (Di). (MEV 3482x - escala 2,5µm).

D. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 48h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar (↑), hiperplasia (▲) células em degeneração celular (dc) e núcleos de diversos tamanhos (★). (HE 1000x - escala 10µm).

E. Vista superficial do epitélio da lamela primária exposto em água acidificada 48h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais (Di). (MEV 3687x - escala 2,5µm).

FIGURA 8



## FIGURA 9

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em água acidificada 96h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar ( ↑ ), degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos ( ▼ ) e grânulos eosinófilicos no citoplasma das hemáceas (**ge**). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Vista superficial do epitélio da lamela primária em exposição em água acidificada 96h. Observar a recuperação da disposição das microssaliências das células epiteliais ( ↑ ). (MEV 2267x- escala 5µm).

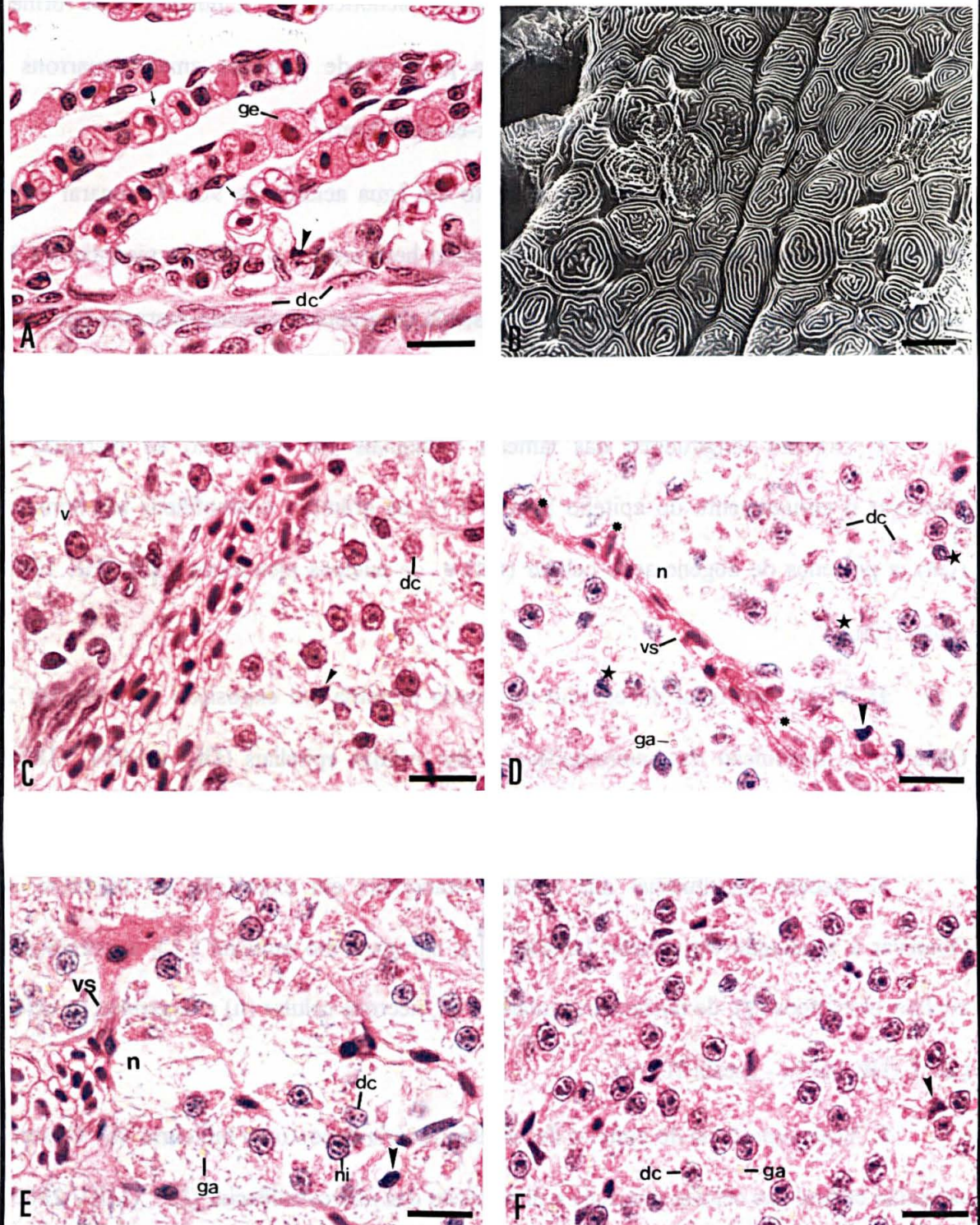
C. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 2h. Observar vacuolização citoplasmática nos hepatócitos (**v**), núcleos picnóticos ( ▼ ) e degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 4h. Observar a necrose celular (**n**) próxima ao vaso sanguíneo (**vs**), presença de núcleos picnóticos ( ▼ ), núcleos com formatos variáveis ( ★ ), núcleos totalmente degenerados (**dc**), grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**) e hemáceas com formatos irregulares ( \* ). (HE 1000x -escala 10µm).

E. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 8h. Observar a necrose celular (**n**) próxima ao vaso sanguíneo (**vs**), presença de núcleos picnóticos ( ▼ ), células em degeneração celular (**dc**), grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**), e núcleos íntegros (**ni**). ( HE 1000x- escala 10µm).

F. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 24h. Observar células hepáticas em degeneração celular (**dc**), com núcleos picnóticos ( ▼ ), e a presença de grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**). ( HE 1000x-escala 10µm).

FIGURA 9



## FIGURA 10

A. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 48h. Observar as células hepáticas em degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (  $\nabla$  ), núcleos com formatos variáveis (  $\star$  ), núcleos íntegros (**ni**) e a presença de grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**). ( HE 1000x-escala 10 $\mu$ m).

B. Secção do tecido hepático exposto em água acidificada 96h. Comparar com a Fig.10A e observar o aspecto inchado do tecido hepático ( **i** ). Núcleos picnóticos (  $\nabla$  ), células em degeneração celular (**dc**) e a presença de grânulos amarelo-marrons (**ga**). (HE 1000x-escala 10 $\mu$ m).

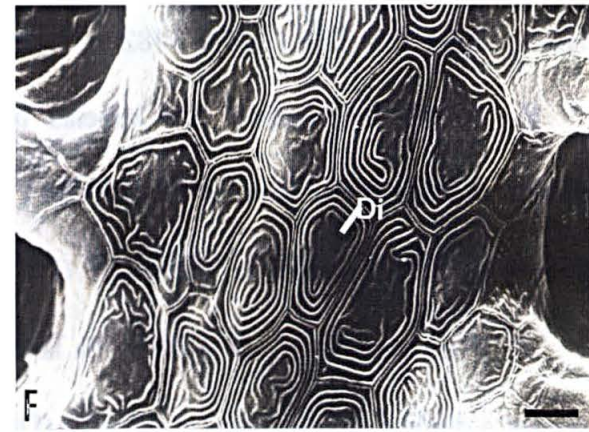
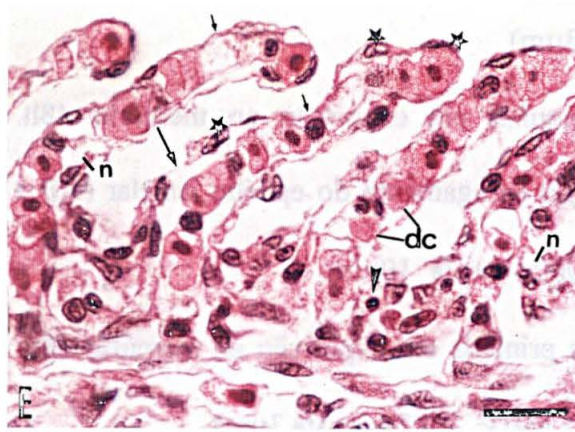
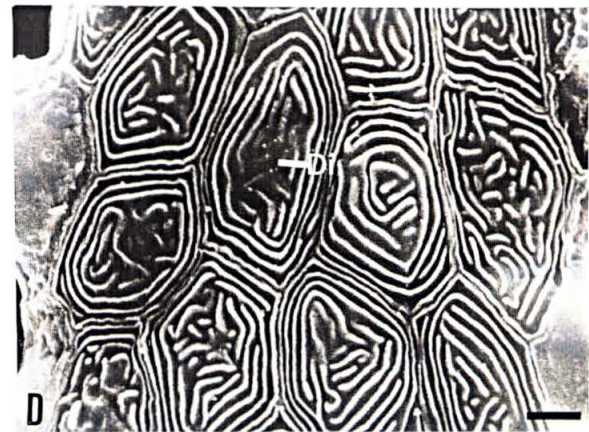
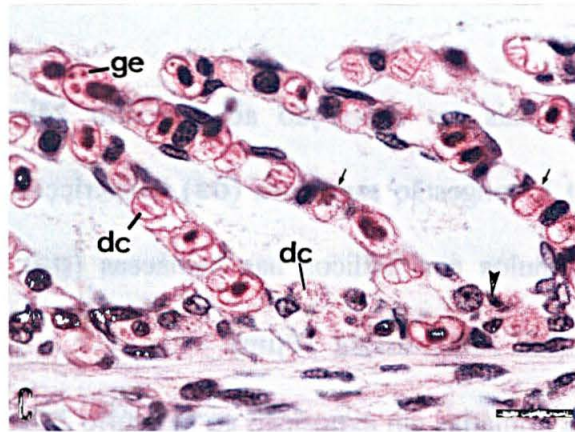
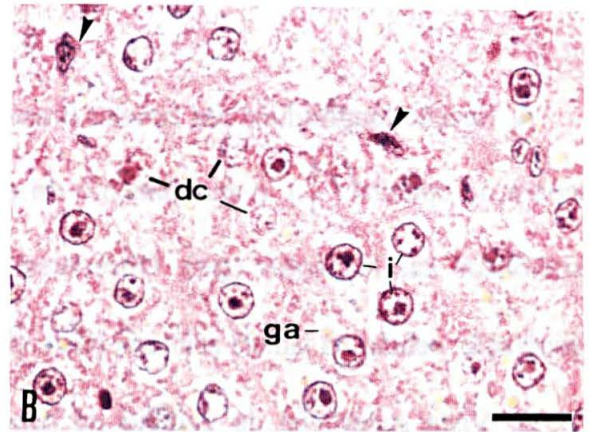
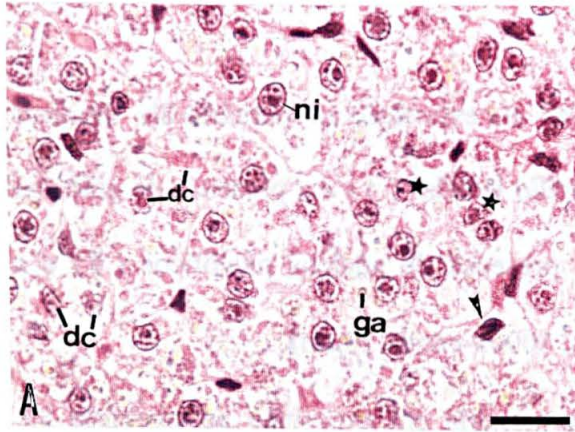
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 2h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar (  $\uparrow$  ), os grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**), a presença de degeneração celular (**dc**) e de núcleos picnóticos (  $\nabla$  ). (HE 1000x-escala 10 $\mu$ m).

D. Vista superficial do epitélio da lamela primária em exposição ao mercúrio 2h. Observar a diminuição das microsaliências das células epiteliais (**Di**). ( MEV 5182x - escala 2 $\mu$ m).

E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 4h. Observar a separação do epitélio lamelar (  $\uparrow$  ), enrugamento epitelial (  $\uparrow$  ), a presença de núcleos picnóticos (  $\nabla$  ), de núcleos irregulares (  $\star$  ), necrose celular (n) e degeneração celular ( **dc** ). (HE 1000x - escala 10 $\mu$ m).

F. Vista superficial do epitélio da lamela primária exposto ao mercúrio 4h . Observar na região central das células epiteliais a diminuição das microsaliências (**Di**). (MEV 2803x-escala 4 $\mu$ m).

FIGURA 10



## FIGURA 11

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 8h. Verificar a separação epitelial (↑), o enrugamento do epitélio lamelar (†) e a presença de grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**). Observa-se a presença de núcleos picnóticos (▼) e a degeneração celular na lamela primária (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Vista superficial do epitélio da lamela primária em exposição ao mercúrio 8h. Verificar o padrão normal na disposição das microssaliências (↑). (MEV 3687x-escala 3µm).

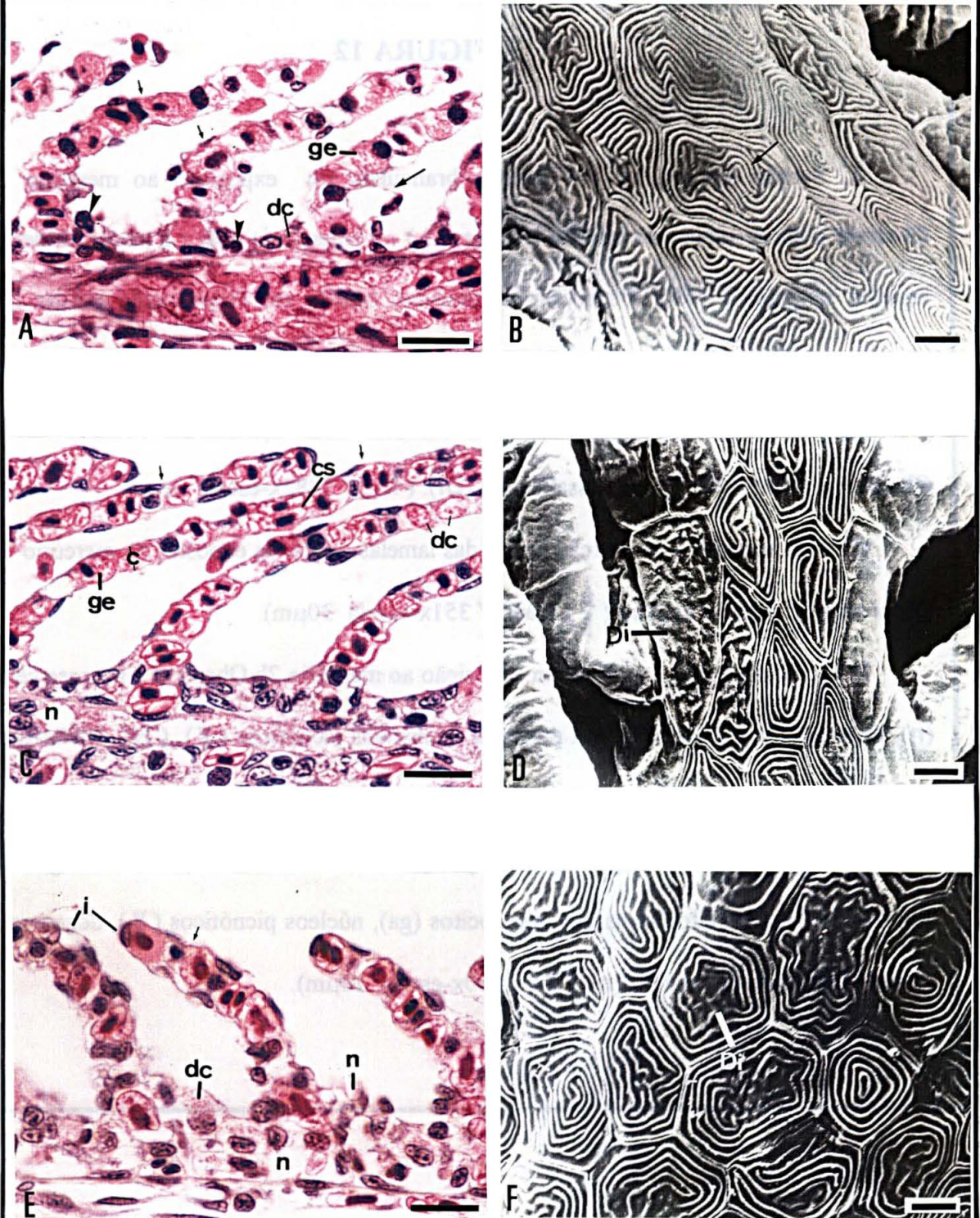
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 24h. Observar: o enrugamento do epitélio lamelar (†), congestão sanguínea (**cs**), constricção dos espaços sanguíneos (**c**), a presença de grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**), degeneração celular (**dc**) e a necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio 24h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais nas regiões próximas as lamelas secundárias (**Di**). (MEV 3482x -escala 3µm).

E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 48h. Observar o inchaço das lamelas secundárias (**i**), o enrugamento do epitélio lamelar (†), a degeneração (**dc**) e a necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

F. Vista superficial do epitélio da lamela primária em exposição ao mercúrio 48h. Observar a diminuição das microssaliências (**Di**). (MEV. 3687x-escala 3µm).

FIGURA 11



## FIGURA 12

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio 96h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar (↑), a hiperplasia (■) e a pouca nitidez dos espaços sanguíneos (**es**). Observam-se, também, células em degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼) e necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

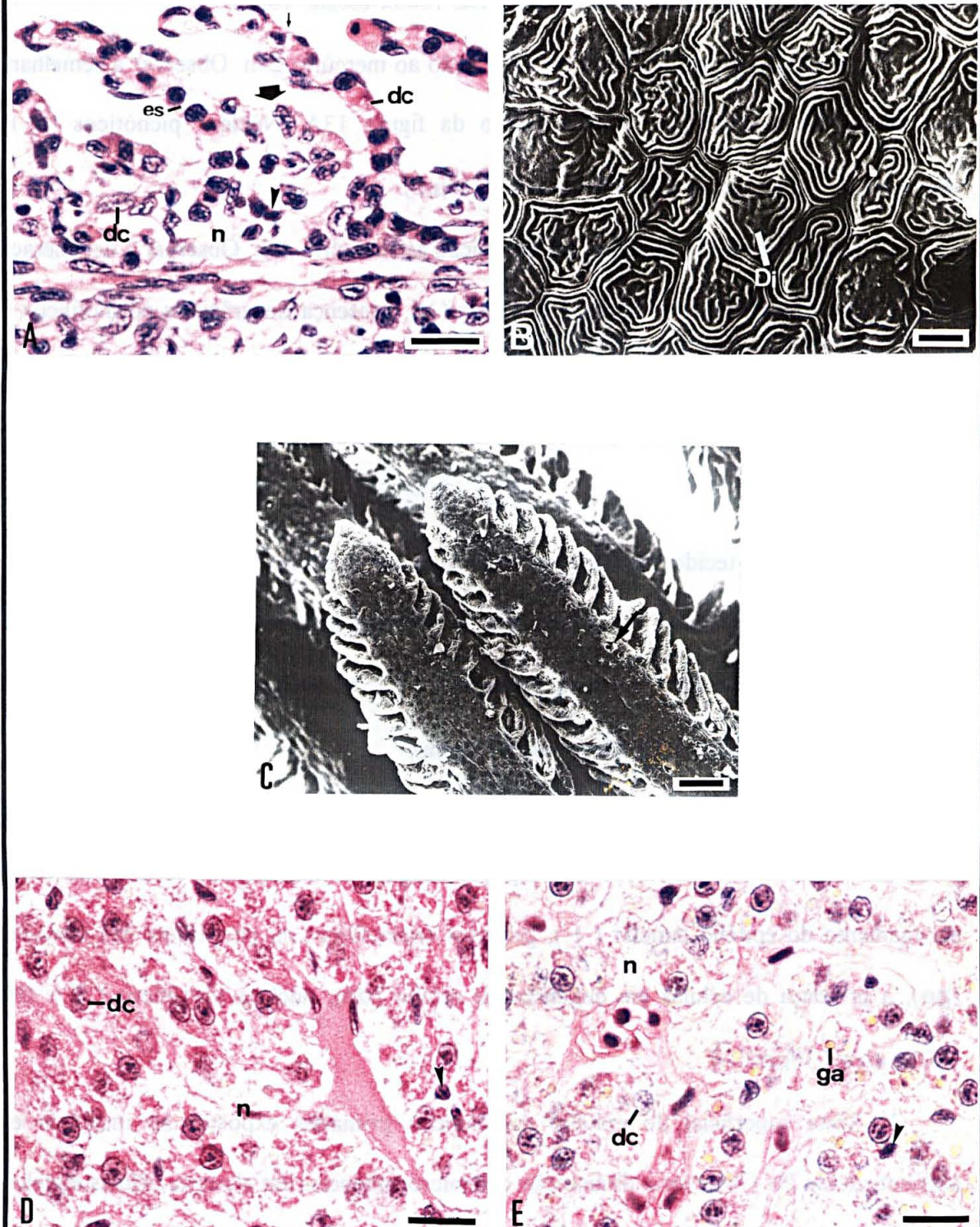
B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias em exposição ao mercúrio 96h. Observar a diminuição das microssaliências (**Di**). (MEV 3482x-escala 3µm).

C. Vista superficial da porção apical das lamelas primárias expostas ao mercúrio 96h. Observar a ruptura do epitélio (↑). (MEV 351x-escala 30µm).

D. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 2h. Observar a necrose celular (**n**), degeneração celular (**dc**), e a presença de núcleos picnóticos (▼). (HE 1000x-escala 10µm).

E. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 4h. Observa-se grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**), núcleos picnóticos (▼), degeneração celular (**dc**) e necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

FIGURA 12



### FIGURA 13

A. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 8h. Observar núcleos picnóticos (▼) e degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 24h. Observar a semelhança das alterações morfológicas com o tecido da figura 13A. Núcleos picnóticos (▼) e degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

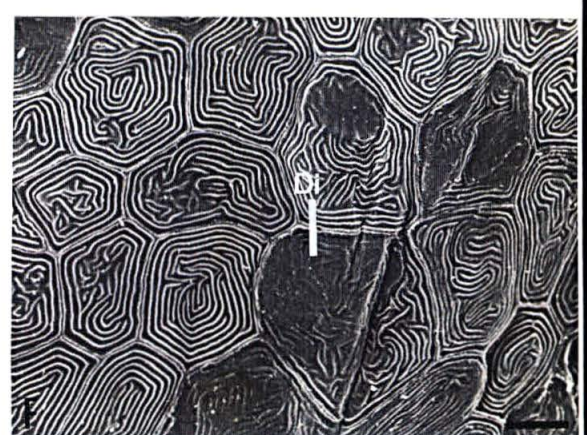
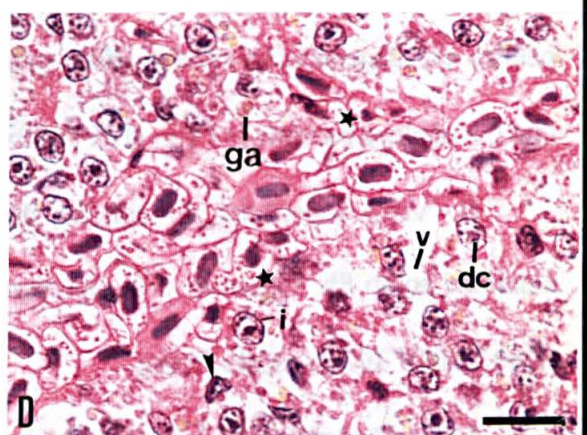
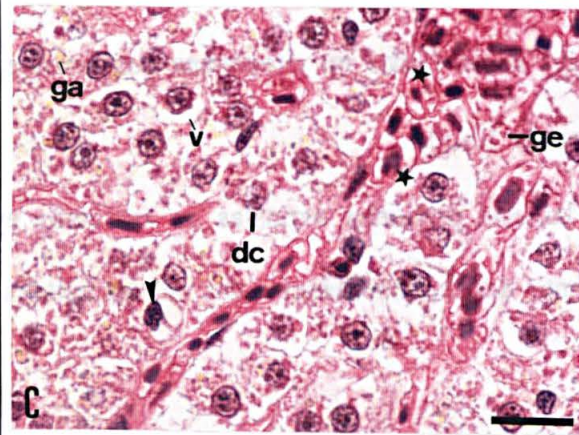
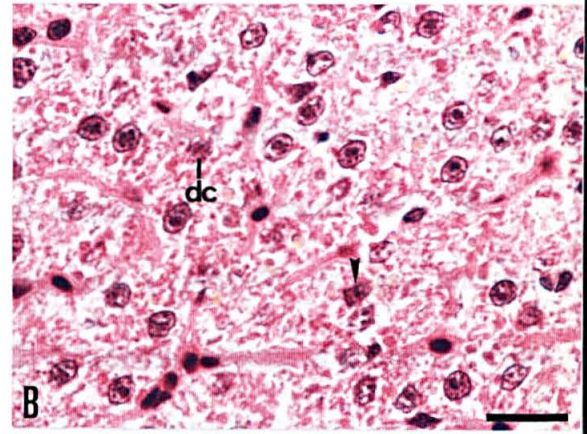
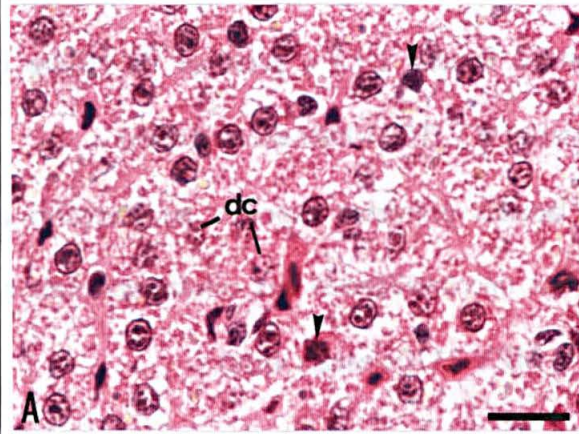
C. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 48h. Observar a degeneração celular (**dc**), hemáceas com formato irregular (★), presença de grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemáceas (**ge**), vacuolização citoplasmática (**v**), núcleos picnóticos (▼) e a presença de grânulos amarelo-marrons no citoplasma dos hepatócitos (**ga**). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Secção do tecido hepático em exposição ao mercúrio 96h. Observar o aspecto inchado do tecido hepático (**i**), a presença de grânulos amarelo-marrons (**ga**), hemáceas com formato irregular (★), núcleos picnóticos (▼), vacuolização citoplasmática (**v**) e degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 2h. Observar a constrição dos espaços sanguíneos nas lamelas secundárias (**c**), o enrugamento do epitélio lamelar (↑), grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemáceas (**ge**), a presença de células em degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼). (HE 1000x-escala 10µm).

F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 2h. Observar a diminuição das microsaliências em algumas células epiteliais (**Di**). (MEV 2802x-escala 4µm).

FIGURA 13



## FIGURA 14

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 4h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar ( † ) a presença de células em degeneração celular (**dc**) e de núcleos picnóticos ( ▼ ). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 4h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais nas regiões próximas as lamelas secundárias (**Di**). (MEV 2370x-escala 4µm).

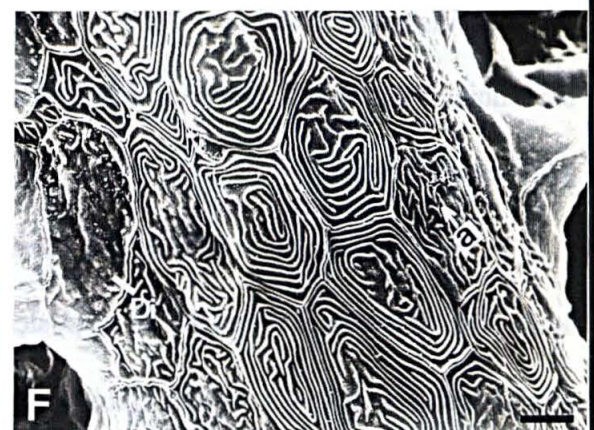
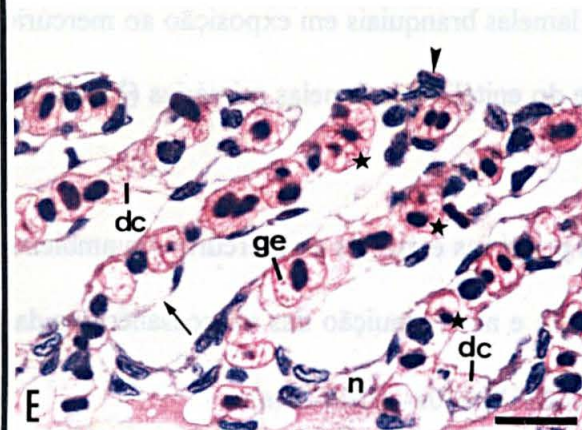
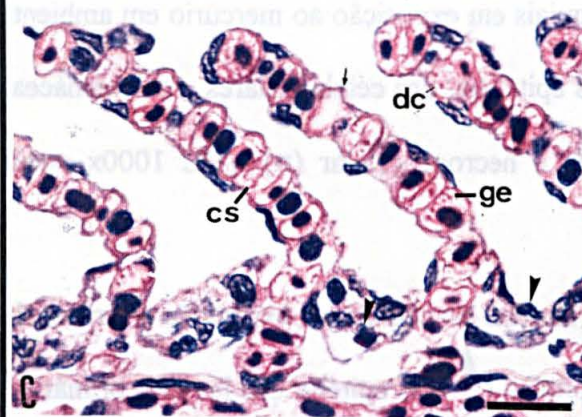
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 8h. Observar o enrugamento do epitélio lamelar ( † ), congestão sangüínea (**cs**), células em degeneração celular (**dc**), grânulos eosinofílicos no citoplasma das hemáceas (**ge**), e núcleos picnóticos ( ▼ ). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 8h. Observar o desaparecimento das microssaliências das células epiteliais (**De**). (MEV 3070x-escala 3µm).

E. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 24h. Observar a separação do epitélio lamelar ( † ), a presença de grânulos eosinofílicos nas hemáceas (**ge**), hemáceas degeneradas (**dc**) e alteradas em sua forma e tamanho ( ✱ ), núcleos picnóticos ( ▼ ), células em degeneração celular (**dc**) e necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 24h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais (**Di**) e alteração da disposição (**a**). (MEV 3482x-escala 3µm).

FIGURA 14



## FIGURA 15

A. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 48h. Observar a separação do epitélio lamelar (↑), hemáceas em degeneração celular (**dc**) e núcleos picnóticos (▼). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 48h. Observar a diminuição das microssaliências das células epiteliais (**Di**). (MEV 3687x-escala 3µm).

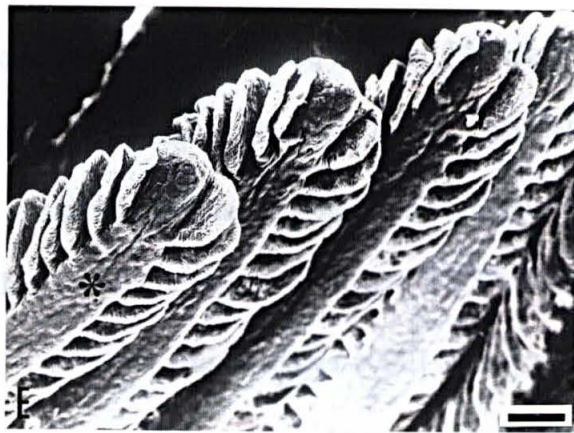
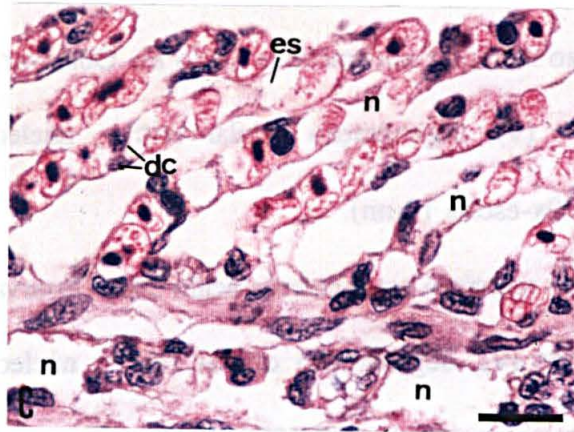
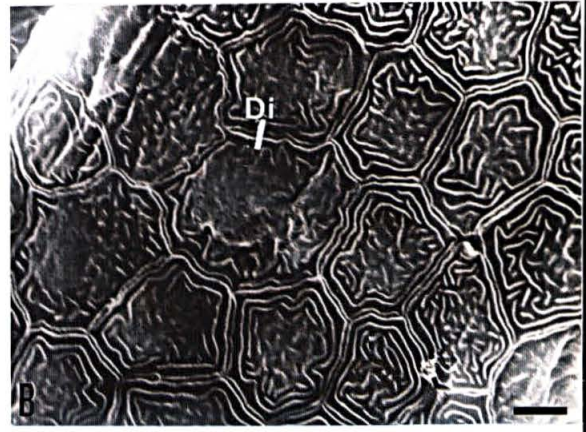
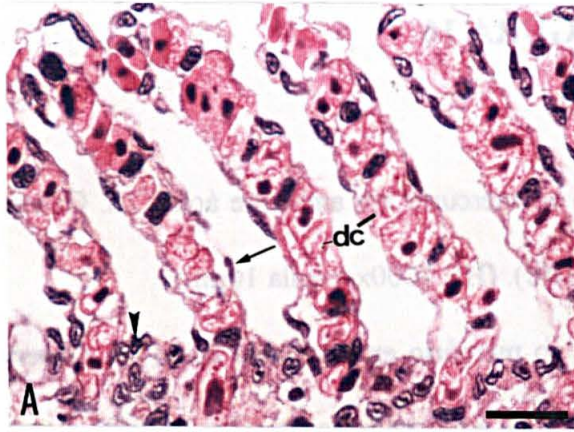
C. Secção longitudinal das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 96h. Observar a degeneração das células epiteliais, das células pilares e das hemáceas (**dc**), espaços sanguíneos pouco nítidos (**es**) e necrose celular (**n**). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Vista superficial da porção apical das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 96h. Observar a ruptura epitelial (↑) no epitélio das lamelas primárias. (MEV 351x-escala 30µm).

E. Vista superficial da porção apical das lamelas branquiais em exposição ao mercúrio em ambiente ácido 48h. Observar a integridade do epitélio das lamelas primárias (✱). (MEV 351x-escala 30µm).

F. Vista superficial do epitélio das lamelas primárias expostas ao mercúrio em ambiente ácido 96h. Observar a alteração na disposição (**a**) e na diminuição das microssaliências das células epiteliais (**Di**) e a ruptura epitelial (↑). (MEV 2370x-escala 4µm).

FIGURA 15



## FIGURA 16

A. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 2h. Observar núcleos picnóticos (▼) e degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

B. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 4h. Observar núcleos picnóticos (▼), degeneração celular (**dc**) e a presença de grânulos amarelo-marrons (**ga**). (HE 1000x-escala 10µm).

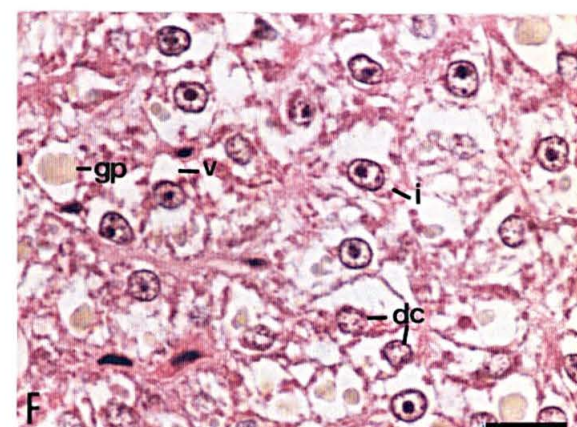
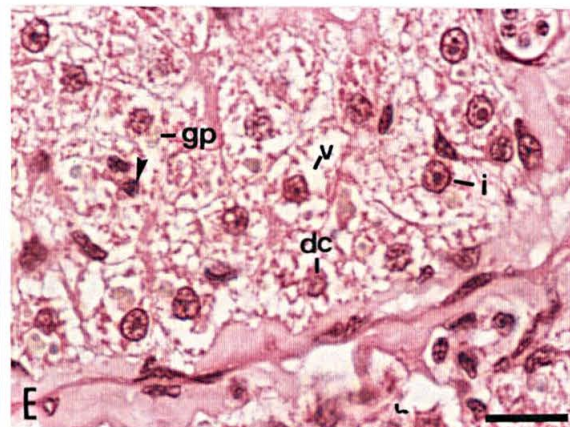
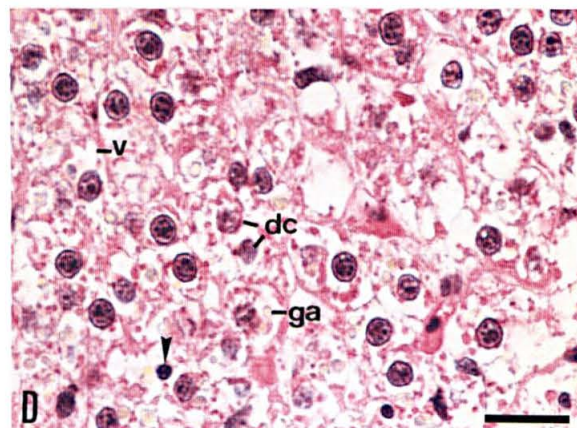
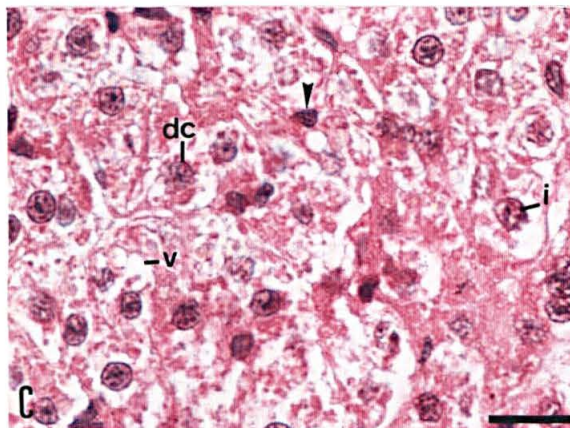
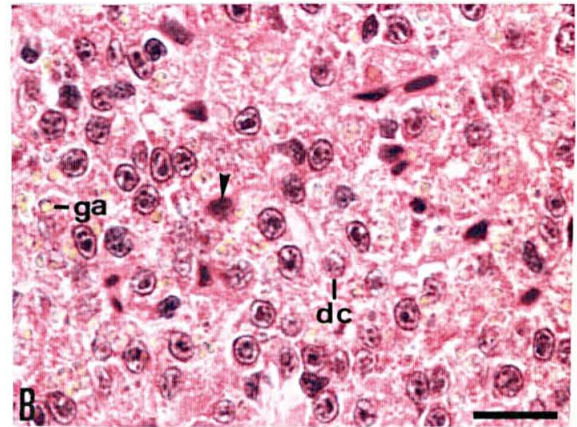
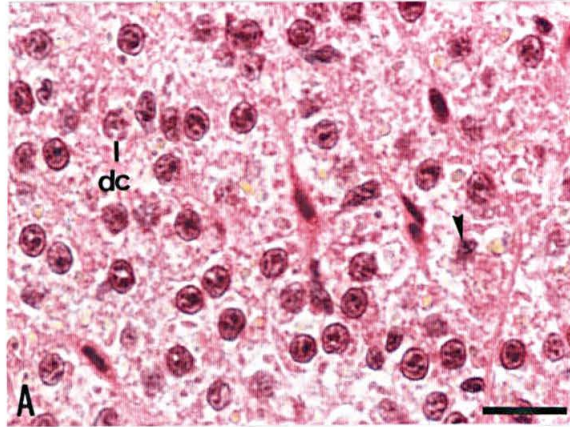
C. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 8h. Observar a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos (**v**), degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼) e inchaço celular (**i**). (HE 1000x-escala 10µm).

D. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 24h. Observar a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos (**v**), degeneração celular (**dc**), núcleos picnóticos (▼) e presença de grânulos amarelo-marrons (**ga**). (HE 1000x-escala 10µm).

E. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 48h. Observar a vacuolização citoplasmática (**v**), o inchaço celular (**i**), núcleos picnóticos (▼), a presença de grânulos pardos (**gp**) e a degeneração celular (**dc**). (HE 1000x-escala 10µm).

F. Secção do tecido hepático exposto ao mercúrio em ambiente ácido 96h. Observar a vacuolização citoplasmática (**v**), o inchaço celular (**i**), a degeneração celular intensificada (**dc**) e a presença de grânulos pardos grandes (**gp**). (HE 1000x-escala 10µm).

FIGURA 16



## 5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas houve um crescente esforço direcionado ao estudo da poluição do ambiente aquático, principalmente no que se refere a interações de dois ou mais poluentes no mesmo organismo (PELLETIER, 1985).

A poluição por mercúrio e por águas ácidas tem sido reconhecida em muitas áreas do mundo por interferir na saúde dos organismos. JARDIM (1983) relatou o desaparecimento da vida aquática em alguns rios do País de Gales devido a contaminação por mercúrio. BAKIR et al., 1973 relataram que em Minamata e Niigata foram registrados 1200 casos de homens contaminados por metilmercúrio em 1956. CAHON et al. (1987) verificaram que em águas acidificadas ocorre a redução da variedade das espécies e dominância por poucas espécies. PACKER e DUNSON (1969) relataram que rios da Pensilvânia não conseguem manter populações de peixes devido a condições de pH baixo. BEAMISH (1976) verificou que em condições ácidas as fêmeas de algumas espécies não ovulam.

O efeito da interação do mercúrio com águas ácidas vem sendo estudado por pesquisadores tendo sido analisada no comportamento bioquímico do mercúrio (STEFFAN et al., 1988; BLOOM et al., 1991) e na concentração de mercúrio em peixes (DRUMMOND et al., 1974; STEFFAN et al., 1988; BLOOM et al., 1991; WREN et al., 1991).

A concentração letal (LC 50) de mercurio inorgânico é bastante variada entre as espécies. WHO (1991) estabeleceu a LC 50 para peixes de água doce variando entre 33 à 400µg Hg/L. Já DIAZ et al. (1994) determinaram a concentração de 0,14 à 0,970 ppm para peixes de água doce e 0,043 à 1,72 ppm para peixes eurialinos. DELAMARRE e

TRUCHET (1984) registraram 2,5% de mortes a 1 ppm em 4 dias e 90% de mortes a 5 ppm em 10 dias para o peixe *Brachidanio rerio*. KHANGAROT e SOMANI (1980) determinaram a concentração de 0,25 ppm como sendo letal para 90% dos indivíduos de *Puntius sophore*.

A concentração letal de mercúrio inorgânico obtida para *M. roosevelti* foi de 0,2 mg Hg/L. A concentração subletal foi estabelecida em 0,1 mgHg/L. Entretanto para outra espécie nativa, *Trichomycterus brasiliensis* (OLIVEIRA RIBEIRO et. al. 1995), a concentração de 0,1 mgHg/L foi letal em menos de 24 horas.

A diferença da concentração letal de mercúrio para as duas espécies nativas poderia ser atribuída a adaptação a hábitos de vida diferentes: a espécie *Trichomycterus brasiliensis* caracteriza-se por ser peixe de fundo, carnívoro e com maior atividade natatória noturna. A espécie *M. roosevelti* caracteriza-se por ser um peixe de coluna d'água com pouco contato com o sedimento, preferencialmente herbívora e com maior atividade natatória diurna.

Como o mercúrio é um metal pesado que tende a acumular-se em sedimentos, um peixe de hábito de fundo tenderia a um contato mais prolongado e com uma maior concentração de mercúrio. A sensibilidade dos peixes a este metal, talvez, fizesse com que eles se afastassem do local contaminado quando o metal estivesse em concentrações baixas. A maior deposição do mercúrio em sedimentos foi verificada por MALM et al. (1990) que registraram uma concentração de 157 µgHg/g em sedimento no fundo do Rio Madeira e em peixes desta região uma concentração de 2,7 µgHg/g.

Outro fator importante a ser salientado é a diferença na constituição da pele do corpo, sendo *Trichomycterus brasiliensis* um peixe coreáceo e *M. roosevelti* um peixe com escamas. Este fator poderia determinar uma maior ou menor entrada do mercúrio via

superfície corporal. Na realidade não se determinou quanto do metal foi efetivamente absorvido e causou as patologias observadas. A concentração subletal é apenas aquela com a qual o peixe esteve em contato.

Segundo vários autores existem uma série de fatores que podem modificar o efeito tóxico do mercúrio no organismo dos peixes, como por exemplo a época da reprodução. Assim, NICOLETO e HENDRICKS (1988) verificaram níveis mais elevados de mercúrio em fêmeas que em machos pela maior ingestão de alimento pelos primeiros na época da reprodução. Portanto, nesta época, a mesma concentração de mercúrio no meio seria mais tóxica para as fêmeas. AKIELASZEK e HAINES (1981) verificaram que o alto nível de mercúrio característico de certas espécies de peixes pode ser o resultado de sua posição no nível trófico, sendo mais alto quanto mais alta a posição do organismo na cadeia alimentar. WOBESER (1975b) encontrou, para *Salmo gairdneri*, um aumento da resistência a compostos mercuriais com o aumento da idade e do tamanho dos peixes. Correspondentemente, AKYAMA (1970) verificou maior suscetibilidade nos grupos mais jovens de uma população.

O nível de tolerância à acidez ambiental também revela-se muito variada entre as espécies. HILL et al. (1988) verificaram que o limite de tolerância inferior para *Micropterus dolomieu* é de 5.5, espécie bastante suscetível a acidificação. PLAYLE e WOOD (1989) relatam que a LC 50 para *Salmo gairdneri* é o pH 4.3 em 12 horas de exposição. JAGOE e HAINES (1983) verificaram para *Salvelinus alpinus oquassa* a morte de 4 indivíduos em 7 no pH 4 em experimentos de 96 horas.

Casos de animais extremamente tolerantes também já foram reportados. KAWALL (1993), mostrou que o peixe *Gymnocorymbus ternetzi* é uma espécie com alta tolerância à acidez já que mais que 50% dos indivíduos sobreviveram a um pH 3 por 96 horas. Já DUNSON et al. (1977) registraram para a espécie *Cheirodon axelrodi* a tolerância ao pH

3 por 2,4 horas em pH 3.25 por 7 horas.

O “European Inland Fisheries Advisory Commission ” (1969) recomendou a adoção de um intervalo de pH 5,0 a 9,0 como um critério de qualidade aceitável da água para peixes de água doce, mesmo que não tenha sido determinado a resposta crônica subletal deste intervalo (HARGIS, 1976).

Assim *M. roosevelti*, está no limite inferior da faixa considerada como de qualidade aceitável, já que o nível de pH 5,0 mostrou ser subletal no decorrer de 96 horas.

Ao analisarmos os níveis de concentração letal de mercúrio e de águas acidificadas entre as espécies de peixes verificamos a grande variabilidade desses níveis. Esta variabilidade não nos permite fazer uma generalização desses níveis entre as espécies e sim conhecer esses valores, para que, estudos sejam realizados em níveis subletais desses poluentes. Níveis subletais que são considerados seguros por não provocarem a morte dos indivíduos podem, entretanto, causar alterações significativas nas funções vitais, comprometendo a saúde dos organismos temporariamente ou até para o resto da vida.

Nesse trabalho buscou-se primeiramente a caracterização dos níveis subletais de águas ácidas e mercúrio inorgânico para o peixe *M. roosevelti*. A partir deste ponto fez-se o estudo interativo desses poluentes com o emprego de bioensaio seguido de análise histopatológica. O bioensaio é uma técnica que permite total controle de cada um dos fatores e de sua ação conjunta, ao longo do tempo, com manutenção da constância dos outros fatores ambientais. É recomendado para avaliações da qualidade do meio ambiente (CAIRNS e DICKSON, 1973; FANTA-FEOFILOFF, 1983; FANTA-FEOFILOFF et al., 1983; FANTA-FEOFILOFF et al., 1986; SILVA et al., 1993)

A análise histopatológica foi realizada tanto no tecido branquial como no hepático.

O tecido branquial foi escolhido para esta investigação por frequentemente ser um sítio primário à ação de agentes tóxicos devido a seu contato direto com o meio aquoso e é

um útil indicador da qualidade ambiental (MALLATT, 1985).

No tecido branquial do peixe *M. roosevelti* foram observadas várias alterações morfológicas deletérias em exposição subletal tanto do mercúrio como de águas ácidas, bem como quando da interação dos agentes poluentes.

A ação da água acidificada fez-se sentir já nos primeiros horários de exposição. Após 2h de exposição das brânquias ao ambiente ácido foram observadas várias alterações entre elas o enrugamento epitelial. O enrugamento epitelial pode ter ocorrido segundo CHEVALIER et al.(1985), devido a perda de água para o meio externo hipertônico. Segundo MALLATT (1985) esta alteração ocorre com muito pouca frequência em organismos expostos a diversos poluentes ambientais, aparecendo menos de dez vezes em uma análise de 130 publicações.

Em *M. roosevelti* exposto em água acidificada os problemas circulatórios não foram intensos, pois não foram verificados casos de hemorragia nem congestão sanguínea. Foram observadas apenas alterações que revelam o comprometimento de algumas hemácias, que sugere uma redução na capacidade de captação do oxigênio. BUTLER et al. (1992) evidenciaram a hemoconcentração aumentando a viscosidade do sangue. CHEVALIER et al. (1985) verificaram alterações circulatórias somente em pHs inferiores a 5,0. FROMM (1980) relaciona as alterações circulatórias com a diminuição da capacidade de transporte de oxigênio pela hemoglobina devido a alta concentração de íons hidrogênio.

A diminuição das microssaliências do epitélio lamelar, a ruptura epitelial e o aparecimento de focos de hiperplasia foram registrados entre 8 e 48 horas, após a exposição ao ácido, não persistindo, entretanto, até às 96 horas. Ao contrário, após 96h de exposição o tecido apresenta uma recuperação sugerindo que o animal pode ter se adaptado ao meio ocorrendo uma acomodação tecidual ao estresse ácido. JAGOE e HAINES (1983) estudando o efeito de estresse ácido agudo no peixe *Salvelinus alpinus oquassa* verificaram

o desaparecimento das microssaliências do epitélio lamelar, o enrugamento do epitélio das lamelas secundárias e hiperplasia intensa com fusão das lamelas secundárias adjacentes. Segundo MALLATT (1985) a hiperplasia caracteriza uma resposta de defesa do organismo pelo aumento da distância a ser cruzada pelo agente agressor no tecido, mas que pode vir a causar sufocamento. Já a ruptura epitelial é um efeito deletério do agente agressor ao organismo.

As microssaliências são estruturas frequentemente encontradas na superfície branquial dos peixes, com localização e funções que geram discussão (STOFELLA, 1994). Em *M. roosevelti* as microssaliências foram observadas no epitélio das lamelas primárias. Já PEREIRA (1988) observou no peixe *Scophthalmus aquosus* microssaliências em células epiteliais das lamelas secundárias. Com relação ao desaparecimento das microssaliências HUGHES (1979) comenta que as diferentes funções desta estrutura ficariam comprometidas como o aumento da superfície respiratória, a produção de microturbulência que favoreceria a captação de oxigênio e o ancoramento do muco com finalidade de proteção contra agentes microbianos. Já HOSSLER et al. (1986) sugerem que serviria para reduzir a espessura da barreira sangue-água, facilitando as trocas gasosas.

A ação tóxica do mercúrio no tecido branquial pode ser percebida já nos primeiros horários de exposição quando entre 2 e 8h verifica-se entre outras alterações a separação do epitélio lamelar, quadro este que persiste no decorrer das 48 horas de exposição.

A separação do epitélio lamelar foi causada tanto pelo mercúrio quanto pela atuação do mercúrio em água acidificada. MALLATT (1985) relata essa alteração como a mais comum das alterações registradas entre as substâncias tóxicas. Ocorreria devido a infiltração de fluido podendo causar hipóxia no peixe. MACHADO (1995) também registrou esta lesão no peixe *M. roosevelti* exposto a organofosforado em concentrações letais e subletais. Já DAYE e GARSIDE (1975) registraram a separação do epitélio apenas

em pH letal. KAWALL (1993) observou a separação do epitélio lamelar em pH 4,5.

KANGAROT e SOMANI (1980) encontraram no peixe *Puntius sophore*, exposto ao mercúrio, alterações morfológicas bastantes semelhantes às apresentadas por *M. roosevelti*. Porém a hiperplasia foi observada em 96 horas após exposição ao mercúrio em *M. roosevelti*, enquanto que em *Puntius sophore* sua expressão mais acentuada e com fusão lamelar foi às 24 horas. Essa diferença no tempo e na intensidade do aparecimento da hiperplasia provavelmente deve-se ao fato da concentração empregada para *Puntius sophore* ter sido letal em 24 horas de exposição. Para OLIVEIRA RIBEIRO et al. (1994) a fusão lamelar também foi verificada em exposição à concentração letal em 24h.

DAOUST et al. (1984) verificaram hipertrofia e hiperplasia levando a fusão lamelar no tecido branquial de peixes expostos a concentração de 0,35 mg/L de mercúrio e 0,135 mg/L de cobre. Segundo estes autores a fusão lamelar poderia ser causada pela alteração da carga das glicoproteínas de membrana pelos cátions dos metais pesados, interferindo nas atividades de crescimento e reconhecimento celular.

HANDY e PENRICE (1993) verificaram em administração oral de mercúrio, além da hipertrofia e hiperplasia, o aumento de melanomacrófagos. OLIVEIRA RIBEIRO et al. (1994) em 4h de exposição ao mercúrio inorgânico verificaram hipertrofia e acúmulo de polimorfonucleados.

Os pontos de ruptura epitelial verificados após 96 horas de exposição ao mercúrio inorgânico refletem o seu poder deletério sobre o tecido branquial. MALLATT (1985) verificou em análise estatística dos resultados de 130 publicações que a necrose do epitélio lamelar é a alteração mais frequentemente associada com metais pesados e entre esses o mercúrio mostrou-se especialmente citotóxico.

STINSON e MALLATT (1989) e BALLATORI et al. (1988) verificaram que a membrana celular é a organela alvo ao efeito do mercúrio. A sua ação aumentaria a

permeabilidade à cátions monovalentes e outras pequenas moléculas. REDDY et al. (1988) evidenciaram a inibição das enzimas de membrana  $\text{Ca}^{++}$  ATPase e  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase. RANA e SHARMA (1982) verificaram que a inibição de enzimas como a glucose-6-fosfatase pode causar danos no retículo endoplasmático e de desidrogenases danos na mitocôndria. Esta ação do mercúrio na membrana celular, em enzimas e também em outras moléculas é causada pela interação do mercúrio com grupos sulfidrílicos presentes nos componentes celulares (RANA e SHARMA, 1982; THOMAS e WOFFORD, 1984; ALLEN et al., 1988; BARGHIGIANI et al., 1989; HEISINGER e WAIT, 1989; BAATRUP, 1991.).

A diminuição das microssaliências das células epiteliais apresentou-se acentuada às 4 horas de exposição voltando ao padrão normal ao término do experimento. PEREIRA (1988) encontrou a fragmentação das microssaliências em exposição crônica à concentração de  $10\mu\text{g/L}$  de mercúrio.

Na análise histopatológica do tecido branquial submetido a ação do mercúrio inorgânico com água acidificada a pH 5,0 verificou-se que a acidez da água interfere na toxicidade do mercúrio intensificando o seu poder agressor. Isto ficou bem demonstrado pois, após 96 horas de exposição, verificamos no tecido branquial a ruptura epitelial em toda a extensão da superfície lamelar. Tal alteração compromete o funcionamento normal do órgão, afetando, não só, a função de troca gasosa, como também, a de barreira física à entrada de agentes tóxicos e ao ataque de microorganismos oportunistas.

A entrada dos tóxicos mercúrio e íons hidrogênio presentes na água faz-se principalmente pela sua absorção através do epitélio branquial (OLSON et al., 1973), seguindo a distribuição pelo organismo através da circulação sanguínea. Como o fígado está envolvido em uma série de processos metabólicos vitais, dentre eles o importante papel na metabolização de agentes tóxicos, geralmente é um órgão alvo a ação destes poluentes.

Nas três situações experimentais sob as quais o peixe *M. roosevelti* foi submetido:

água acidificada à pH 5,0, mercúrio inorgânico e mercúrio inorgânico em água acidificada à pH 5,0 foram verificadas histopatologias hepáticas, comprovando que o fígado é um órgão alvo a ação destes poluentes. O que diferenciou nas três situações experimentais foram as intensidades das histopatologias evidenciadas.

BANO e HASAM (1990) verificaram no peixe *Heteropneustes fossilis* exposto a 0,2 mg/L de mercúrio por 30 dias necrose focal, desorganização dos cordões hepáticos, atrofia centrilobular e hipertrofia dos hepatócitos. STUDNICKA (1984) em 6 imersões do peixe *Ictalurus nebulosus* na concentração de 0,15 mgHg/L verificou congestão, degeneração e necrose do tecido hepático. KRÜGER (1993) submetendo o peixe *Rutilus rutilus* a água ácida de pH inconstante de 5.5 a 6.7, observou perda de glicogênio, atrofia, núcleos picnóticos e degeneração vacuolar dos hepatócitos.

No peixe *M. roosevelti* a vacuolização citoplasmática nos hepatócitos apresentou-se mais intensificada nas primeiras horas de exposição em água acidificada à pH 5,0 . Para o mercúrio inorgânico e na ação da interação dos dois agentes tóxicos apresentou-se intensificada em 96 horas de exposição. Segundo HIBIYA (1982) esta vacuolização caracteriza a degeneração hidrofílica, ou seja a precipitação de proteínas no citoplasma dos hepatócitos.

Mesmo em baixa concentração, o mercúrio pode desativar enzimas sulfidrílicas e precipitar proteínas, o que o caracteriza como um veneno celular potente porém inespecífico. Por BOSE et al. (1993) foi verificada a interação do mercúrio não só com proteínas, como também com o DNA e RNA em frações subcelulares do fígado. É justamente a partir deste efeito primário do mercúrio nos componentes celulares que lesões morfológicas são observadas nos tecidos.

Com relação ao mercúrio inorgânico sabe-se que o fígado é um sítio de concentração via sangue, com capacidade alta de acumulá-lo e baixa de eliminá-lo

(JULSHAMMN, 1982). BAATRUP et al., (1986) demonstraram histoquimicamente a presença do mercúrio inorgânico nos lisosomas dos hepatócitos expostos ao mercúrio por 14 dias. HANDY e PENRICE (1993 ) evidenciaram no fígado o aumento significativo de mercúrio nos primeiros sete dias, seguindo por um período aparente de eliminação do tóxico.

O inchaço celular apresentou-se com maior intensidade às 96 horas nas três situações experimentais. Em águas ácidas neste mesmo tempo de exposição o inchaço foi mais marcante. KAWALL (1993) observou no pH 5,0 inchaço dos hepatócitos, o qual acentuava-se à níveis de pH inferiores.

O aumento observado dos grânulos amarelo-marrons no tecido hepático pode ter sido em decorrência da estagnação da bile. Este aumento verificado com maior intensidade na interação dos agentes tóxicos. Tanto o aparecimento dos grânulos amarelo-marrons nos hepatócitos quanto o aparecimento dos grânulos eosinofílicos nas hemáceas confirmam a caracterização da indução da degeneração celular pelos agentes tóxicos (HIBIYA, 1982).

A evidenciação dos núcleos picnóticos nas três situações experimentais não foi marcante o suficiente para possibilitar a caracterização da intensidade de injúria pelos agentes tóxicos. AL-SABATI (1994) verificou o efeito genotóxico do mercúrio pela indução do aparecimento de micronúcleos nos eritrócitos do peixe *Carasius auratus gibelio*.

Tanto o tecido hepático como o branquial revelaram-se mais sensíveis à ação dos dois agentes tóxicos quando atuavam simultaneamente do que a cada um dos agentes isoladamente. Esta intensificação da ação do mercúrio em pH ácido pode ter se dado pela somatória de alguns fatores como a maior estabilidade química do mercúrio em pH ácido e o efeito agressor do mercúrio somado com o efeito da acidez. DRUMMOND et al. (1974) observaram em brânquias de truta em exposição ao mercúrio inorgânico em pH 6,0 o

aumento de 0,2 para 3.6 ugHg/g. Isto sugere que em pH ácido ocorre a entrada de uma maior concentração de mercúrio no organismo via tecido branquial. Esta maior entrada poderia ser explicada por STEFFAN et al. (1988 ) que verificaram a perda do mercúrio por volatilização de apenas 2% sob condições de acidez e o aumento da concentração de mercúrio em peixes de lago de pH baixo.

Se realmente ocorreu um aumento da concentração do mercúrio na água, isto pode ter levado a uma entrada maior do metal no organismo do peixe. VERMA et al.(1984) verificaram que a toxicidade do mercúrio aumenta com a mudança de pH 7.8 para 5.8. RICHARDSON et al. (1995) verificaram, em peixes consumidos pela população humana local, aumento do nível de mercúrio em lagos de níveis baixos de pH.

Assim, em regiões geográficas com águas interiores naturalmente acidificadas ou em áreas industrializadas o aporte de um metal pesado como o mercúrio causará danos potencialmente maiores à fauna de peixes do que em regiões onde a água tiver pH neutro, mesmo que as concentrações de mercúrio sejam consideradas subletais.

## 6.CONCLUSÕES

6.1. A morfologia do tecido branquial de *M. roosevelti* é semelhante à da maioria dos peixes teleósteos; as lamelas primárias caracterizam-se por apresentarem epitélio formado por células de contorno poligonal; as lamelas secundárias são foliáceas, triangulares, caracterizando-se por apresentar epitélio simples pavimentoso de superfície lisa, com espaços sangüíneos delimitados por células pilares. Estes aspectos permanecem inalterados em todas as situações experimentais.

6.2. O tecido hepático do peixe *M. roosevelti* difere do de alguns dos peixes teleósteos, pois os hepatócitos são arranjados aleatoriamente em todo o tecido e seu arranjo permanece inalterado em todas as situações experimentais.

6.3. As patologias apresentadas pelo tecido branquial sob o efeito de água acidificada, de mercúrio inorgânico à concentração de 0,1 mg/L e da interação destes poluentes foram: enrugamento epitelial, células com formatos irregulares, núcleos picnóticos, degeneração celular, necrose celular, grânulos eosinofílicos, constrição dos espaços sangüíneos, diminuição das microvili das células epiteliais das lamelas primárias e ruptura epitelial. Hiperplasia foi observada somente no tecido exposto em água acidificada e em mercúrio inorgânico. Separação do epitélio lamelar e congestão sangüínea foram observadas somente no tecido exposto ao mercúrio inorgânico e na interação do mercúrio com água acidificada.

6.4 As histopatologias hepáticas apresentadas sob o efeito de água acidificada, mercúrio inorgânico a concentração de 0,1 mg/L e na interação destes poluentes foram: vacuolização citoplasmática, núcleos picnóticos, degeneração celular, necrose celular, inchaço celular, grânulos eosinofílicos nas hemáceas e grânulos amarelo-marrons nos hepatócitos.

6.5. De acordo com a intensidade das histopatologias observadas nos experimentos, o peixe *M. roosevelti* mostrou-se mais sensível à ação de mercúrio inorgânico quando em água acidificada do que à ação de cada um dos agentes tóxicos isoladamente.

## APÊNDICE 1: SOLUÇÕES E CORANTES

### ÁCIDO SULFÚRICO 0,1M

**Volume da solução: 50 ml**

Ácido sulfúrico.....	2,71 ml
Água destilada.....	50,00 ml

**Preparo:** Adicionar o ácido sulfúrico em água destilada.

**Bibliografia:** PIMENTEL, 1966

### FIXADOR BOUIN

**Volume da solução: 50 ml**

Solução aquosa de ácido pícrico saturada.....	37,50 ml
Formaldeído.....	12,50 ml
Ácido acético glacial.....	2,50 ml

**Preparo:** Misturar os componentes da fórmula. Adicionar o ácido acético glacial no momento do uso.

**Bibliografia:** CULLING et al., 1985

### MERCÚRIO INORGÂNICO- SOLUÇÃO ESTOQUE

**Volume da solução: 500 ml**

Cloreto de mercúrio.....0,50 g  
 Água destilada.....500 ml

**Preparo:** Misturar os reagentes até obter uma solução homogênea. A partir desta solução estoque , efetuar diluições para as concentrações de 0,2 mg Hg/ ml, 0,1 mg Hg/ ml e 0.05 mg Hg/ ml.

**Bibliografia:** PIMENTEL, 1966

### GLUTARALDEÍDO a 3% em TAMPÃO CACODILATO

**Volume da solução: 50 ml**

Glutaraldeído em solução aquosa 50%.....3 ml  
 Ácido cacodílico 0,4M.....25 ml  
 Água destilada .....22 ml

**Preparo:** Misturar os componentes da fórmula com luvas e máscara e sob capela. Conservar a solução fixadora sob refrigeração ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) e aferir o pH para 7,2 com soluções de HCl ou NaOH.

**Bibliografia:** modificado a partir de GLAUBERT, 1986.

## ALBUMINA DE MAYER

**Volume da solução: 50 ml**

Glicerina.....	1 parte
Clara de ovo.....	1 parte
Cristais de timol	

**Preparo:** Agitar a glicerina com clara de ovo por 30 minutos. Filtrar e acrescentar alguns cristais de timol para evitar fungos. Conservar sob refrigeração.

**Bibliografia:** CULLING et al., 1985.

## HEMATOXILINA DE HARRIS

**Volume da solução: 50 ml**

Hematoxilina.....	0,25 g
Alúmen de potássio ou de amônio.....	5,00 g
Óxido de mercúrio vermelho.....	0.12 g
Álcool 95% P.A. ....	2,50 g
Ácido acético glacial.....	1,20 ml
Água destilada.....	50,00 ml

**Preparo:** Dissolver a hematoxilina no álcool 95% e reservar. Dissolver o alúmen de potássio em água destilada fervente. Misturar as duas soluções e adicionar o óxido de mercúrio vermelho. Esfriar em água corrente, filtrar e adicionar ácido acético.

**Bibliografia:** modificado a partir de CULLING et al., 1985.

**EOSINA****Volume da solução: 50 ml**

Eosina.....	0,50 g
Álcool 95% P. A.....	40,00 ml
Água destilada.....	10,00 ml

**Preparo:** Para a solução estoque, misturar os reagentes até obter uma solução homogênea. A solução para uso terá uma parte de eosina 1% e três partes de álcool a 80% P.A. Acrescentar 0,50 ml de ácido acético glacial para cada 95 ml de solução de eosina para uso.

**Bibliografia:** modificado a partir de CULLING et al., 1985.

## APÊNDICE 2: COLORAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA

### 1. Hematoxilina e Eosina

- a. Desparafinizar com dois banhos de xileno, por 3 minutos cada.
- b. Hidratar em série decrescente e gradual de alcoóis 100%, 90% e 70%, por 3 minutos cada.
- c. Lavar em água corrente e a seguir em destilada.
- d. Corar com Hematoxilina de Harris por 3 minutos.
- e. Lavar em água corrente e a seguir em destilada.
- f. Contra-corar com Eosina por 2 minutos.
- g. Lavar em água corrente e a seguir em destilada.
- h. Desidratar em série crescente e gradual de alcoóis 95% ( rapidamente ), 100% e 100%, por 3 minutos cada.
- i. Tratar em álcool 100% e xileno ( 1:1 ), por 3 minutos.
- j. Diafanizar em dois banhos de xileno, por 3 minutos cada.
- K. Montar lâminas permanentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIELASZEK, J.J.; HAINES, T.A. Mercury in the muscle tissue of fish from three Northern Maine Lakes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.27, p.201-208, 1981.
- AKYAMA, A. Acute toxicity of two organic mercury compounds to the teleost, *Oryzias latipes*, in different stages of development. **Bull. J. Sci. Fish.**, v.36, n.6, p. 563-570, 1970.
- AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blacked fish erythrocyte cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.320, p.157-163, 1994.
- ALLEN, P. Changes in the haematological profile of the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) during acute inorganic mercury intoxication. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 108C, n.1, p. 117-121, 1994a.
- ALLEN, P. Mercury accumulation profiles and their modification by interaction with cadmium and lead in the soft tissues of the cichlid *Oreochromis aureus* during chronic exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.53, p.684-692, 1994b.
- ALLEN, P.; MIN, S.Y.; KEONG, W. M. Acute effects of mercuric chloride on intracellular GSH levels and mercury distribution in the *Oreochromis aureus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 40, p. 178-184, 1988.

ARAÚJO, G. M. N.; PEDRENHO, A. R.; HASSON-VOLOCH, A. The effect of mercury and aluminum on sodium-potassium-mg<sup>2+</sup> dependent-adenosine triphosphatase activity of *Electrophorus electricus* (L.) electrocyte. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.25, n.12, p.1729-1735, 1993.

AVELLAR, R.M.B. **Regulação osmótica no siri azul *Callinectes danae* Smith, 1869. Efeitos do pH ácido ambiental.** São Paulo, 1990, 126p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

AZIZ, F.; SHAKOORI, A.R. Toxic effects of mercury chloride on the blood serum proteins and free amino acids of fresh water fish *Labeo rohita*. **Pak. J. Zool.**, Lahore, v 24, n.4 , p.362-365, 1992.

BAATRUP, E. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs of fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.100C, n.1/2, p.253-257, 1991.

BAATRUP, E. ; DOVING, K. B. Histochemical demonstration of mercury in the olfactory system of salmon (*Salmo salar* L.) following treatments with dietary methylmercuric chloride and dissolved mercuric chloride. **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, Duluth, v.20, p.277-289, 1990.

BAATRUP, E. Selenium-induced autometallographic demonstration of endogenous zinc in organs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Histochemistry.**, v.90, p.417-425, 1989.

BAATRUP, E.; NIELSEN, M.G. DANSCHER, G. Histochemical demonstration of two mercury pools in trout tissues: mercury in kidney and liver after mercuric chloride

- exposure. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** Duluth., v.12, p.267-282, 1986.
- BAKER, L.A.; HERLIHY, A.T.; KAUFMANN, P.R.; ELLERS, J.M. Acidic lakes and streams in the United States: the role of acidic deposition. **Science (Washington DC)**. v.252, p.1151-1154, 1991.
- BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N.Y.; TIKRITI, S.; DHAHIR, H.J. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science (Washington DC)**, v.181, p.230-241, 1973.
- BALLATORI, N.; SHI, C.; BOYER, J.L. Altered plasma membrane ion permeability in mercury-induced cell injury: studies in hepatocytes of elasmobranch *Raja erinacea*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v.95, p.279-291, 1988.
- BANO, Y.; HASAN, M. Histopathological lesions in the body organs of catfish (*Heteropneustes fossilis*) following mercury intoxication. **J. Environ. Sci. Health**, New York, v. 25, n. 1, p. 67-85, 1990.
- BARGHIGIANI, C.; PELLEGRINI, D.; CARPENE, E. Mercury binding proteins in liver and muscle of flat fish from the Northern Tyrrhenian Sea. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.94C, n.1, p. 309-312, 1989.
- BARREGARD, L. Biological monitoring of exposure to mercury vapor. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.19, n.1, p.45-49, 1993.
- BATTRAM, J.C. The effects of aluminium and low pH on chloride fluxes in the brown trout, *Salmo trutta* L. **J. Fish. Biol.**, London, v.32, p.937-947, 1988.
- BEAMISH, R.J. Acidification of lakes in Canada by acid precipitation and the resulting

- effects on fishes. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.6, p.501-514, 1976.
- BEAMISH, R.J. Growth and survival of white suckers (*Catostomus commersoni*) in an acidified lake. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v.31, n.1, p.49-54, 1974.
- BENNETT, B.G. Exposure commitment assessments of environmental pollutants. **Monitoring and assessment research centre**, v.1, n. 2, p.1-16, 1981.
- BHASKAR, M.; GOVINDAPPA, S. Tissue compensatory metabolic profiles in *Tilapia mossambica* (Peters) on acclimation to sublethal acidic and alkaline media. Gill glycogen metabolism. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, Liege, v.93, p.59-63, 1985.
- BJORKLUND, I.; BORG, H.; JOHANSSON, K.; Mercury in Swedish Lakes - its regional distribution and causes. **Ambio.**, Oxford, v.13, n.2, p.118-121, 1984.
- BLOOM, N.S.; WATRAS, C.J.; HURLEY, J.P. Impact of acidification on the methylmercury cycle of Remote Seepage Lakes. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.56, p. 477-491, 1991.
- BOETUS, J. Lethal action of mercuric chloride and phenylmercuric acetate on fishes. **Medd. Dan. Fisk Havunders.**, Charlottenlund, v.3, n.4, p.93-115, 1960.
- BOROVYAGIN, V.; HERNADI, L.; SALANKI, M. Mercury and cadmium induced structural alterations in the taste buds of the fish *Alburnus alburnus*. **Acta. Biol. Hung.**, Budapest, v.40, n.3, p.237-254, 1989.
- BOSE, S.; GHOSH, P.; GHOSH, S.; BHATTACHARYA, S. Distribution kinetics of inorganic mercury in the subcellular fractions of fish liver. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.1, p. 533-538, 1993.

- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. **Aquatic ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies**. Florida: Crc Press Inc., 1989. v.1, p. 77-96.
- BROSSET, C. The behavior of mercury in the physical environment. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.34, p.145-166, 1987.
- BUTLER, P.J.; DAY, N.; NAMBA, K. Interactive effects of seasonal temperature and low pH on resting oxygen uptake and swimming performance of adult Brown Trout *Salmo trutta*. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v.165. p.195-212, 1992.
- CAHON, C. P.; PASCOE, D.; MCKAVANAGH, C. Histochemical observations on the salmonides *Salmo solar* and *Salmo trutta* L. and the ephemeropterans *Bactis rhodani* (Piet ) and *Ecdyopurus venosus* (Fahr) following a simulated episode of acidity in an upland stream. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.153, p.3-12, 1987.
- CAIRNS, J.; DICKSON, K.L. **Biological methods for the assesment of water quality**. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1973. 256p.
- CÂMARA, V. M.; CAMPOS, R. C.; FRANKEL, P.; PERZ, M. A.; FALCÃO, M.P. Estudo comparativo dos efeitos da utilização de mercúrio por dentistas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.6, n.2, p.186-200, 1990.
- CARLSON, R.W. The influence of pH, dissolved solids upon ventilatory and cough frequencies in the bluegill *Lepomis macrochirus* and brook trout *Salvelinus fontinalis*. **Environ. Pollut.**, Barking, v.34, p.149-169, 1984.
- CARVALHO, C. E. V.; LACERDA, L.D. Heavy metals in the Guanabara Bay biota . Why such low concentrations. **Ciênc.Cult.(São Paulo)**, v.44, n.2/3, p.184-186, 1992.

- CHANG, L.W.; HARTMANN, H.A. Ultrastructural studies of the nervous system after mercury intoxication. **Acta Neuropathol. Suppl.**, Berlin, v.20, p. 122-138, 1972.
- CHEVALIER, G.; GAUTHIER, L.; MOREAU, G. Histopathological and electron microscopic studies of gills of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, from acidified lakes. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.63, p.2062-2070, 1985.
- CHRISTENSEN, G. M. Biochemical effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride and lead nitrate on embryos and alevins of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v.32, p. 191-197, 1975.
- CHRISTENSEN, G.; HUNT, E.; FLANDT, J. The effect of methylmercuric chloride, cadmium chloride and lead nitrate on six biochemical factors of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v.42, p.523-530, 1977.
- COOPER, J. J. Total mercury in fishes and selected biota in Lahontan Reservoir, Nevada:1981. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 31, p. 9-17, 1983.
- CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. 4. ed. London: Butterworth, 1985. 642p.
- CUVIN, M. L. A.; FURNESS, R. W. Uptake and elimination of inorganic mercury and selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. **Aquat. Toxicol. (Amst. )**, v.13, p.205-216, 1988.
- CYRIAC, P.J.; ANTONY, A.; NAMBISAN, P.N.K. Hemoglobin and hematocrit values

- in the fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.43, p.315-320, 1989.
- D'ITRI, P. A.; D'ITRI, F. M. Forum mercury contamination: a human tragedy. **Environ. Manage.**, New York, v.2, n.1, p. 3-16, 1978.
- DAOUST, P. Y.; WOBESER, G.; NEWSTEAD, J.D. Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gills of rainbow trout. **Vet. Pathol.**, Washington, v.21, p.93-101, 1984.
- DAYE, P.G.; GARSIDE, E.T. Histopathologic changes in surficial tissues of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), exposed to acute and chronic levels of pH. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.54, p.2140-2155, 1976.
- DAYE, P.G.; GARSIDE, E.T. Lethal levels of pH for brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.53, p.639-641, 1975.
- DELAMARRE, P.; TRUCHET, M. Comparative study of mercury and cadmium exposure in a freshwater fish (*Brachydanio rerio*). Histological microanalysis of Cd-induced mineral concretions. **Vie Milieu**, Paris, v.34, n.2-3, p.79-86, 1984.
- DIAZ, C.; PADRON, G.; FRÍAZ, I.; HARDISSON, A.; LOZANO, G. Concentrations of mercury in fresh and salted marine fish from the Canary Islands. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.3, p. 246-248, 1994.
- DIVELY, J. L.; MUDGE, J. E.; NEFF, W. H.; ANTHONY, A. Blood, P<sub>o2</sub>, P<sub>co2</sub> and pH changes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to sublethal levels of acidity. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.57A, p. 347-351, 1977.

- DOUDOROFF, P.; KATZ, M. Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. **Toxicity of industrials Wastes to Fish.**, v. 22, n.11, p. 1433-1458, 1950.
- DRUMMOND, R. A.; OLSON, G. F.; BATTERMAN, A. R. Cough response and uptake of mercury by brook trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to mercuric compounds at different hydrogen - ion concentrations. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v.103, n.2, p. 244-249, 1974.
- DUNSON, W.A.; SWARTS, F.; SILVESTRI, M. Exceptional tolerance to low pH of some tropical black-water fish. **J. Exp. Zool.**, Cambridge, v.201, p. 157-162, 1977.
- ERIKSSON, M. O. G. Susceptibility to freshwater acidification by two species of loon: red-throated loon (*Gavia stellata*) and arctic loon (*Gavia artica*) in Southwest Sweden. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 279/280, p. 439-444, 1994.
- EVANS, R.D. Sources of mercury contamination in the sediments of small headwater lakes in South - Central Ontario, Canada. **Arch. Environ. Contam.Toxicol.**, New York, v.15, p. 505-512, 1986.
- EYSINK, G.G. A presença de mercúrio nos ecossistemas aquáticos do Estado de São Paulo. **Riscos e Consequências do uso do Mercúrio**, Rio de Janeiro, p.12-23, 1990.
- FAGERSTRON, T.; JERNELOV, A. Some aspects of the quantitative ecology of mercury. **Water Res.**, Oxford, v.6, p. 1193-1202, 1972.
- FANTA, E. Influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v.38, p. 1237-1251, 1995.

- FANTA-FEOFILOFF, E. Temperature and low oxygen tolerance in three species of fresh water Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v.26, n.4, p.495-507, 1983.
- FANTA-FEOFILOFF, E.; EIRAS, D.R. DE B.; BOSCARDIM, A.T.; LACERDA-KRAMBECK, M. Effect of salinity on the behavior and oxygen consumption of *Mugil curema* (Pisces, Mugilidae). **Physiol. & Behav.**, Tarrytown, v.36, p.1029-1034, 1986.
- FANTA-FEOFILOFF, F.; TAKAHASHI, N.S.; BOSCARDIM, A.T. Behavioural changes with temperature increase in the Ariidae *Genidens genidens* (Teleostei, Siluriformes). **Arq. Biol. Tecnol.** Curitiba, v.26, n.4, p.535-544, 1983.
- FARMANFARMAIAN, A.; SUN, L.; PUGLIESE, K.; HANNOUSH, P. Sites of mercury inhibition of amino acid transport in fish gut. **Mar. Environ. Res.**, Duluth, v.24, p.203-206, 1988.
- FILENKO, O.F.; XIHUA, D.; XULONG, C.; YUQI, Z. Distribution of mercury in the tissues of carp and its biological effects. **Hydrobiol. J.**, Bethesda, v.24, n.4, p.64-68, 1988.
- FLETCHER, T.C.; WHITE, A. Nephrotoxic and haematological effects of mercuric chloride in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Aquat. Toxicol.( Amst. )**, v.8, p.77-84, 1986.
- FOWLER, H.W. **Os peixes de água doce do Brasil**. 1 ed. São Paulo: Arq. Zool., 1950. v.6, p.392-398.

- FREDA, J.; McDONALD, G. Physiological correlates of interspecific variations in acid tolerance in fish. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v.136, p.243-258, 1988.
- FROMM, P. O. A review of some physiological and toxicological response of freshwater fish to acids stress. **Environ. Biol.**, Ithaca, v.5, n.1, p.79-93, 1980.
- GALLOWAY, J.N.; COSBY JR, B.J. Acid precipitation: measurement of pH and acidity. **Limnol.Oceanogr.**, Grafton, v.24, n.6, p.1161-1165, 1979.
- GALLOWAY, J.N.; DIANWU, Z.; JILING, X.; LIKENS, G.E. Acid rain: China, United States, and a remote area. **Science ( Washington DC )**, v.236, p.1559-1562, 1987.
- GÉRY, J. **The characidas of the world**. New Jersey: T.F.H. Neptune City, 1977. 672p.
- GÉRY, J.; FRANCE, C.N.R.S. The Serrasalminidae (pisces, characidae) from the Serra do Roncador, Mato Grosso, Brasil. **Amazoniana**, Kiel, v.6, n.4, p. 467-495, 1979.
- GIESSMANN, G. H. **Interação, crescimento e comportamento de *Tilapia rendalli* (Ciclidae) e *Metynnis roosevelti* (Characidae) (Pisces)**. Curitiba, 1994. 164p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- GILL, T.S.; PANT, J.C. Effects of sublethal concentrations of mercury in a teleost *Puntius conchonius*: biochemical & haematological responses. **Indian J. Exp. Biol.**, New Dehli, v.19, n.6, p.571-573, 1981.
- GLASS, G.E.; LEONARD, E.N. Airborne mercury in precipitation in the lake superior region. **J. G. Lakes Res.**, Ann Arbor, v.12, n.1, p. 37-51, 1986.
- GLAUERT, A.M. ( ed ) **Practical methods in electron microscopy**. 4. ed. New York:

- Elsevier Biomedical Press, 1986. v.5, part I, 311p.
- GLICKSTEIN, N. The potencial loss of dissolved mercury and selenium in marine experimentation. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.10, p.157,1979.
- GLYNN, A.W.; NORRGREN, L.; MUSSENER, A. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of zebrafish *Brachydanio rerio*. **Aquat. Toxicol.(Amst)**., v.30, p. 13-26, 1994.
- GORHAM, E.; MARTIN, F.B.; LITZAU, J.T. Acid rain: ionic correlations in the Eastern United States, 1980-1981. **Science ( Washington D C )**, v. 225, p. 407-409, 1984.
- GOSS, G.G.; WOOD, C.M. The effects of acid and acid / aluminium exposure on circulating plasma cortisol levels and other parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J.Fish. Biol.**, London, v.32, p.63-76, 1988.
- GRAHAM, M.S.; WOOD, C.M. Toxicity of environmental acid to the rainbow trout: interactions of water hardness, acid type, and exercise. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.59, p. 1519-1526, 1981.
- GUIMARÃES, J.R.D. **Padronização de técnicas radioquímicas visando estudos de metilação e volatilização do mercúrio em sistemas aquáticos de áreas de garimpo de ouro na Região Amazônica**. Rio de Janeiro, 1992. 106p. Tese ( doutorado em Ciências)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- HAKANSON, L. The quantitative impact of pH, bioproduction and Hg-contamination on the Hg - content of fish (Pike). **Environ. Pollut.**, Barking, v.1, p. 285- 304, 1980.

HAKANSON, L.; NILSSON A.; ANDERSSON, T. Mercury in fish in Swedish Lakes.

**Environ. Pollut.**, Barking, v.49, p. 145-162, 1988.

HALLER, J. The effects of mercury chloride on the aggressive behavior of *Beta splendens*.

**Stud. Univ. Babes-Bolyai Biol. Najoca**, v.33, n.2, p.66-68, 1988.

HAMMOND, A.L. Mercury in the environment natural and human factors. **Science**

(**Wasghinton D C**), v. 171, p. 788-789, 1971.

HANDY, R.D.; PENRICE, W.S. The influence of high oral doses of mercuric chloride on

organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.106C, n.3, p. 717-724, 1993.

HARGIS, J.R. Ventilation and metabolic rate of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

exposed to sublethal environmental pH. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 196, p. 39-44, 1976.

HEISINGER, J.F.; WAIT, E. The effects of mercuric chloride and sodium selenite on

glutathione and total nonprotein sulphhydryls in the kidney of the black bullhead (*Ictalurus melas*). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.94C, n.1, p.139-142, 1989.

HEISLER, N. Transepithelial ion transfer process as mechanisms for fish acid-base

regulation in hipercapnia e lactocidosis. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.60, p.1108-1122, 1982.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology - Normal and pathological features**. Kodansha

Ltda, 1982, p. 1-92.

HIBIYA, T.; OGURI, M. Gill absorption and tissue distribution of some radionuclides

- (Cr-51, Hg-203, Zn-65, and Ag-110) in fish. **Bull. JPN. Soc. Sci. Fish.**, Minato, v.27, n.11, p.996-1000, 1961
- HILL, J. Analysis of six foraging behaviors as toxicity indicators, using juvenile smallmouth bass exposed to low environmental pH. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 18, p. 895-899, 1989.
- HILL, J.; FOLEY, R.E.; BLAZER, V.S.; WERNER, R.G.; GANNON, J.E. Effects of acidic water on young-of-the-year smallmouth bass ( *Micropterus dolomieu* ) **Environ. Biol. Fish. ( Dordrecht )**, v.21, n.3, p.223-229, 1988.
- HOBE,H. Sulphate entry into soft-water fish (*Salmo gairdneri*, *Catostomus commersoni*) during low ambient pH exposure. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v.133, p.87-109, 1987.
- HONTELA, A.; ROY, Y.; COILLIE, V.; LEDERIS, K.; CHEVALIER, G.; Differential effects of low pH and aluminium on the caudal neurosecretory system of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **J. Fish. Biol.**, London, v.35, p.265-273, 1989.
- HOSSLER, F.E.; HARPOLE, J.H.; KING, J.A. The gill arch of the striped bass, *Morone saxatilis*. I. Surface ultrastructure. **J. Sci. Microsc. Cytol.**, v.18, n.3, p.519-528, 1986.
- HUGHES, G.M. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of trout gills. **J. Zool.**, v.188, p. 443-453, 1979.
- IGER, Y.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v.275, p. 481-492, 1994.

- JACKSON, T. A. The mercury problem in recently formed reservoirs of Northern Manitoba (Canada): effects of impoundment and other factors on the production of methyl mercury by microorganisms in sediments. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, Ottawa, v. 45, p. 97-121, 1988.
- JAGOE, C.H.L.; HAINES, T.A. Alterations in gill epithelial morphology of yearling sunapee trout exposed to acute acid stress. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v.112, p.689-695, 1983.
- JARDIM, W. de F. Metais pesados, um dano irreparável. **Res. Bras. Tecnol.**, Brasília, v.2, p.41-45, 1983.
- JENSEN, A.L. Modeling the effect of acidity on mercury uptake by walleye in acidic and circumneutral lakes. **Environ. Pollut.**, Barking, v.50, p. 285-294, 1988.
- JERNELOV, A.; LANN, H. Mercury accumulation in food chains. **Oikos**, Copenhagen, v.22, p. 403-406, 1971.
- JOHNSTON, J. N.; SAVAGE, G.P. Mercury consumption and toxicity with reference to fish and fish meal. **Nutr. Abst. Rev.**, Bucksburn, v.61, n.2, p. 73-116, 1991.
- JORGENSEN, D.; HEISINGER, J.F. The effects of selenium on the distribution of mercury in the organs of the black bullhead ( *Ictalurus melas* ). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.87C, n.1, p.181-186, 1987.
- JOY, K.P.; KIRUBAGARAN, R. An immunocytochemical study on the pituitary gonadotropic and thyrotropic cells in the catfish, *Clarias batrachus* after mercury treatment. **Biol. Struct. Morphog.**, Paris, v.2, n.2, p.67-70, 1989.

JULSHAMN, K.; RINGDAL, O.; BRAEKKAN, O.R. Mercury concentration in liver and muscle of cod (*Gadus morhua*) as an evidence of migration between waters with different levels of mercury. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.29, p.544-549, 1982.

KANIA, H.J.; O'HARA, J. Behavioral alterations in a simple predator-prey system due to mercury. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v.103, n.1, p.134-136, 1974.

KARLSSON-NORRGREN, L.; BJORKLUND, I.; LJUNGBERG, O.; RUNN, P. Acid water and aluminium exposure: experimentally induced gill lesions in brown trout, *Salmo trutta* L. **J. Fish Dis.**, Oxford, v.9, p.11-25, 1986.

KAWALL, H.G. **Efeitos de águas ácidas em *Gymnocorymbus ternetzi* (Boulenger, 1985) (Pisces, Characidae)**. Curitiba, 1993. 111p. Tese ( Mestrado em Ciências Biológicas- Zoologia )- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KHANGAROT, B.S.; SOMANI, R.C. Toxic effects of mercury on the gills of a freshwater teleost *Puntius sophore* Hamilton. **Curr. Sci. ( Bangalore )**, v.49, n.21, p.832-834, 1980.

KIRUBAGARAN, R.; JOY, K.P. Changes in adrenocortical-pituitary activity in the catfish, *Clarias batrachus* ( L.), after mercury treatment. **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, Duluth, v.22, n.1, p.36-44, 1991.

KIRUBAGARAN, R.; JOY, K.P. Effects of short-term exposure to methylmercury chloride and its withdrawal on serum levels of thyroid hormones in the catfish *Clarias*

*batrachus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.53, p. 166-170, 1994.

KLING, L.J.; SOARES, J.M., JR. The effects of dietary mercury and selenium on the tissue distribution of mercury and selenium and glutathione peroxidase activity. **Poult. Sci.**, Champaign, v.56, p.1728, 1977.

KRÜGER, R. Histopathological changes of roach (*Rutilus rutilus* L.) hepatocytes caused by inconstant alkaline or acid water. **Zool. Anz.**, Jena, v.231, n.5/6, p.153-163, 1993.

LACERDA, L.D. Distribuição e comportamento do mercúrio no ambiente Amazônico. **Riscos e Consequências do uso do Mercúrio**, Rio de Janeiro, p.80-90, 1990.

LACERDA, L.D.; PFEIFFER, W.C.; OTT, A. T.; SILVEIRA, E.G. Mercury contamination in the river Madeira, Amazon - Hg inputs to the environment. **Biotropica**, St. Louis, v. 21, n.1, p.91-93, 1989.

LACROIX, G.L.; HOOD, D.J.; BELFRY, C.S.; RAND, T.G. Plasma electrolytes, gill aluminum content, and gill morphology of juvenile Atlantic salmon (*Salmo solar*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) indigenous to acid streams of Nova Scotia. **Can. J. Zool.**, Duluth, v.68, p.1270-1280, 1990.

LEINO, R.L.; McCORMICK, J.H. Morphological and morphometrical changes in chloride cells of the gills of *Pimephales promela* after chronic exposure to acid water. **Cell Tissue Res.** Heidelberg, v.236, p.121-128, 1990.

LEINO, R.L.; McCORMICK, J.H.; JENSEN, K.M. Multiple effects of acid and aluminum on brook stock and progeny of fathead minnows with emphasis on histopathology.

**Can. J. Zool.**, Duluth, v.68, p.234-244, 1990.

LEINO, R.L.; WILKINSON, P.; ANDERSON, J.G. Histopathological changes in the gills of pearl dace, *Semotilus margarita*, and fathead minnows, *Pimephales promelas*, from experimentally acidified Canadian lakes. **Can. j. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.44, n.1, p.126-134, 1987.

LEIVESTAD, H.; MUNIZ, I.P. Fish kill at low pH in a Norwegian river. **Nature (Lond.)**, v.259, p.391-392, 1976.

LEMLY, A.D.; SMITH, R.J.F. Effects of chronic exposure to acidified water on chemoreception of feeding stimuli in fathead minnows (*Pimephales promelas*): mechanisms and ecological implications. **Environ. Toxicol. Chem.**, Emsford, v.6, p.225-238, 1987.

LIEN, L. Brown trout exposed to acid-treated and nontreated humic water from lake Skjervatyern. **Environ. Int.**, Elmsford, v.20, n.3, p. 349-352, 1994.

LIN, H.; RANDALL, D.J. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v. 149, p. 149-160, 1990.

LINDESTROM, L.; GRAHN, O. Antagonistic effects to mercury in some mine drainage areas. **Ambio**, Oxford, v.11, n.6, p. 359-361, 1982.

LOCHWOOD, A.P.M. (ed) **Effects of pollutants on aquatic organisms**. 1ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1976, 193p.

LOCK, R.A.C.; VAN OVERBEEKE, A. P. Effects of mercury chloride and methylmercuric chloride on mucus secretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri*

- Richardson. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.69C, p. 67-73, 1981
- LOCKHART, W.; LUTZ, A. Preliminary biochemical observations of fishes inhabiting an acidified lake in Ontario, Canada. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.7, p.317-332, 1977.
- MACHADO, M.R. **Efeitos do organofosforado Paration Metílico na morfologia e ultraestrutura branquial do Pacu *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915, e suas implicações ecotoxicológicas.** Curitiba, 1995. 74p. Tese (Mestrado em Morfologia)- Departamento de Biologia Celular - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MACHADO-ALLISSON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia serrasalminae (teleostei, characidae ). Parte II. Discusion sobre la condicion monofiletica de la subfamilia. **Acta Biol. Venez.**, Caracas, v.11, n.4, p. 145-195, 1983.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. J. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.42, p.630-648, 1985.
- MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; SOUZA, C.M.M.; REUTHER, R. Mercury pollution due to gold mining in the madeira river basin, Brazil. **Ambio.**, Oxford, v.19, n.1, p. 11-15, 1990.
- MARTINELLI, L.A.; FERREIRA, J.R.; FORSBERG, B.R.; VICTORIA, R.L. Mercury contamination in the Amazon: a gold rush consequence. **Ambio.**, Oxford, v.17, n.4, p.252-254, 1988.
- MATSUMURA, F.; DOHERTY, Y.G.; FURUKAWA, K.; BOUSH, G.M. Incorporation

of  $^{203}\text{Hg}$  into methylmercury in fish liver: studies on biochemical mechanisms in vitro.

**Environ. Res.**, Duluth, v.10, p. 224-235, 1975.

McCORMICK, J.H.; JENSEN, K.M.; ANDERSON, L.E. Chronic effects of low pH and elevated aluminum on survival, maturation, spawning and embryo-larval development of the fathead minnow in soft water. **Water Air Soil Pollut.** Dordrecht, v.43, p.293-307, 1989.

McDONALD, D.G. The effects of  $\text{H}^+$  upon the gills of freshwater fish. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.61, p.691-703, 1983.

McKIM, J.M.; OLSON, G.F.; HOLCOMBE, G.W.; HUNT, E.P. Long-term effects of methylmercuric chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) toxicity, accumulation, distribution and elimination. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v.33, p. 2726-2739, 1976.

McMURTRY, M. J.; WALES, D. L.; SCHEIDER, W.; BEGGS, G. L.; DIMOND, P. E. Relationship of mercury concentration in lake trout (*Salvelinus fontinalis*) and smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) to the physical and chemical characteristics of Ontario Lakes. **Can. J. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.46, p. 426-434, 1989.

MENENDEZ, R. Chronic effects of reduced pH on Brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, Ottawa, v.33, n.1, p.118-123, 1976.

MICALLEF, S.; TYLER, P.A. Effect of mercury and selenium on the gill function of *Mytilus edulis*. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.21, n.6, p. 288-292, 1990.

MORTIMER, D.C.; KUDO, A. Interaction between aquatic plants and bed sediments in

- mercury uptake from flowing water. **J. Environ. Qual.**, Madison, v.4, n.4, p.491-495, 1975.
- MURTHY, V.K.; REDDANNA, P.; BHASKA, M.; GOVINDAPPA, S. Muscle metabolism of freshwater fish, *Tilapia mossambica* (Peters), during acute exposure and acclimation to sublethal acid water. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.59, p.1909-1915, 1981b.
- MURTHY, V.K.; REDDANNA, P.; GOVINDAPPA, S. Hepatic carbohydrate metabolism in *Tilapia mossambica* (Peters) acclimated to low environmental pH. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.59, n.3, p. 400-404, 1981a.
- NAKAMURA, F. Avoidance behavior and swimming activity of fish to detect pH changes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York. v.37, p.808-815, 1986.
- NELSON, J.A. Critical swimming speeds of yellow perch *Perca flavescens*: comparison of populations from a naturally acidic lake a circumneutral lake in acid and neutral water. **J. Exp. Biol.**, London, v.145, p.239-254, 1989.
- NEUHOFF, H.G.; THEEDE, H. Long-term effects of low copper concentrations at normal and reduced oxygen tensions. **Limnologica**, Berlin, v.15, n.2, p.513-521, 1984.
- NEVILLE, C.M. Sublethal effects of environmental acidification on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish. Res. Board Can.**, v.36, p.84-87, 1979.
- NICHOLLS, D.M. TEICHERT-KULISZEWSKO, K.; GIRGIS, G.R.; Effect of chronic mercuric chloride exposure on liver and muscle enzymes in fish. **Comp. Biochem.**

**Physiol.**, Oxford, v. 94, n.1, p. 265-270, 1989.

NICOLETTO, P.F.; HENDRICKS, A.C. Sexual differences in accumulation of mercury in four species of centrarchid fishes. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 66, p.944-949, 1988.

NORHEIM, G.; HASTEIN, T.; WAASJO, E. Mercury levels in fish in a river habitat after cessation of mercury contamination. **Nord. Veterinaermed.**, Vanlose, v.38, n.5, p.298-302, 1986.

OKAMURA, H.; AOYAMA, I. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. **Environ. Toxicol. Water Quality**, New York, v. 9, p. 7-15, 1994.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A, TURCATTI, N.M.; CARVALHO, C.S.; CARDOSO, R.I.; FANTA, E. Efeito tóxico do cloreto de mercúrio na estrutura dos arcos branquiais de *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces, Siluroidei). **II Simpósio sobre meio Ambiente. Universidade Salgado do Universo**, Rio de Janeiro, p.49-57, 1994.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., TORRES, R.F. Acute effects evaluation of HgCl<sub>2</sub> on epidermis of *Trichomycterus brasiliensis* (Siluroidei, Trichomycteridae). **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, Duluth, v.32, p. 260-266, 1995.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FERNANDES, L. M.; CARVALHO, C. S.; CARDOSO, R. I.; TURCATTI, N. M. Acute effects of mercuric chloride on the olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, Duluth, v.31, p. 104-109, 1995.

OLSON, G.F.; L MOUNT, D.I.; SNARSKI, V.M.; THORSLUND, T. W. Mercury residues in fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, chronically exposed

to methylmercury in water. **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, New York, v.14, n.2, p.129-134, 1975.

OLSON, K.R.; BERGMAN, H.L.; FROMM, P.O. Uptake of methylmercuric chloride by trout: a study of uptake pathways into the whole animal and uptake by erythrocytes in vitro. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v.30, n.9, p. 1293-1299, 1973.

OSKARSSON, A.; OHLIN, B.; OHLANDER, E.M.; ALBANUS, L. Mercury levels in hair people eating large quantities of Swedish freshwater fish. **Food Addit. Contam.**, London, v.7, n.4, p. 555-562, 1990.

PACKER, R.K.; DUNSON, W.A. Effects of low environmental pH on blood pH and sodium balance of brook trout. **J. Exp. Zool.**, New York, v.174, p. 65-72, 1969.

PASSINO, D.R.M.; KRAMER, M. Subcellular distribution of mercury in liver of lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Experientia (Basel)**, v.38, n.6, p.689-690, 1982.

PELLEGRINI, D.; BARGHIGIANI, C. Feeding behavior and mercury content in two flat fish in the Northern Thyrrenian Sea. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.20, n.9, P.443-447, 1989.

PELLETIER, E. Acute toxicity of some methylmercury complexes to *Mytilus edulis* and lack of selenium protection. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.19, n.5, p. 213-219, 1988.

PELLETIER, E. Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: a review. **Mar. Environ. Res.**, Duluth, v.18, p.111-132, 1985.

PELLETIER, E.; LAROCQUE, R. Bioaccumulation of mercury in starfish from contaminated mussels. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.18, n.9, p.482-485, 1987.

- PEREIRA, J.J. Morfological effects of mercury exposure on wiidow pane flounder gills as observed by scanning electron microscopy. **J. Fish. Biol.**, London, v. 33, p. 571-580, 1988.
- PETERSON, D. E.; KANAREK, M. S.; KUYKENDALL, M. A.; DIEDRICH, J. M.; ANDERSON, H.A.; REMINGTON, P.L.; SHEFFY, T.B. Fish consumption patterns and blood mercury levels in Wisconsin Chippewa Indians. **Arch. Environ. Health**, Washington, v.49, n.1, p. 53-58, 1994.
- PETERSON, R.H.; COOMBS, K.; POWER, J.; PAIN, U. Responses of several fish species to pH gradientes. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.67, p. 1566-1572, 1989.
- PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D. Mercury inputs into the amazon region, Brazil. **Environ. Technol. Lett.**, London, v.9, p. 325-330, 1988.
- PFEIFFER, W.C.; MALM, O.; SOUZA,C.M.M.; LACERDA, D.; SILVEIRA, E.G.; BASTOS,W.R. Mercury in the madeira river ecosystem, Rondônia, Brazil. **For.Ecol. Manage.** Amsterdam, v.38, p.239-245, 1991.
- PHILIPS, G.R.; BUHLER, D.R. The relative contributions of methylmercury from food or water to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a controlled laboratory environment. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v.107, n. 6, p. 853-861, 1978.
- PIMENTEL, G.C. **Química: uma ciência experimental**. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1966. 496 p.
- PLAYLE, R. C.; WOOD, C. M. Water pH and aluminum chemistry in the gill micro-environment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. **J. Comp.**

- Physiol.**, Heidelberg, v.159, p.539-550, 1989.
- RAM, R.N.; JOY, K.P. Mercurial induced changes in the hypothalamo-neurohypophysial complex in relation to reproduction in the teleostean fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 41, p. 329-336, 1988.
- RAM, R.N.; SATHYANESAN, A.G. Mercurial induced brain monoamine oxidase inhibition in the teleost *Channa punctatus* (Boch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.35, p.620-626, 1985.
- RAMLAL, P.S.; RUDD, J.W.M.; FURUTANI,A.; XUN,L. The effect of pH on methylmercury production and decomposition in lake sediments. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.42,p.685-692, 1985.
- RANA, S.V.S.; SHARMA, R. Co-enzyme effects of inorganic mercury in the liver of a freshwater fish *Channa punctatus*. **Toxicol. Lett. (Amst.)**, v.11, n.1-2, p.7-18, 1982.
- RASK, M. The effect of low pH on perch, *Perca fluviatilis* L. II. The effect of acid stress on different development stages of perch. **Ann. Zool.**, Fennici, v.21, p.9-13, 1984.
- RASK, M.; VIRTANEN, E. Responses of perch, *Perca fluviatilis* L., from an acid and a neutral lake to acidic water. **Water Air Soil Pollut.** Dordrecht, v.30, p.537-543, 1986.
- REDDY, R.I.; CHARI, N. Influence of cooper and mercury on Ach and AChE of freshwater mussel, *Parreysia rugosa* (Gmelin). **Geobios**, Villeurbanne, v.12, n.3-4, p.151-153, 1985.
- REDDY, R.S.; JINNA,R.R.; UZODINMA, J.E.; DESAIAH, D. In vitro effect of mercury

and cadmium on brain  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the catfish *Ictalurus punctatus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.41, p.324-328, 1988.

RICHARDSON, G.M.; EGYED, M.; CURRIE, D.J.; Does acid increase human exposure to mercury? A review and analysis of recent literature. **Environ. Toxicol. Chem.**, Emsford, v.14, n.5, p 809-813, 1995.

RICHMAN, L.A.; WREN, C.D.; STORES, P.M. Facts and fallacies concerning mercury uptake by fish in acid stressed lakes. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.37, n.3-4, p. 465-473, 1988.

RODGERS, D. W.; BEAMISH, F. W. H. Water quality modifies uptake of waterborne methylmercury by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.40, p.824-828, 1983.

RODHE, H. Acidification in a global perspective. **Ambio**. Oxford, v.18, n.3, p. 155-160, 1989.

RODHE, H.; GALLOWAY, J.; DIANWU, Z. Acidification in Southeast Asia- prospects for the coming decades. **Ambio**, Oxford, v.21, n.2, p.148- 154, 1992.

RUDD, J.M.; FURUTANI, A.; TURNER, M.A. Mercury methylation by fish intestinal contents. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.40, n.4, p.777-782, 1980.

SALAMA, A.; NIKINMAA, M. The adrenergic responses of carp (*Cyprinus carpio*) red cells: effects of  $\text{P}_{\text{O}_2}$  and pH. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v.136, p.405-416, 1988.

- SCHOFIELD, C. L.; DRISCOLL, C.T.; MUNSON, R.K.; YAN, C.; HOLSAPPLE, J.G.  
The mercury cycle and fish in the adirandack lakes. **Environ. Sci. Technol.**,  
Washington, v.28, n.3, p.136-143, 1994.
- SEVERI, W. **Aspectos morfométricos e estruturais das brânquias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, serrasalmidae)**. São Paulo, 1991.  
151p. Tese (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais )- Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.
- SHARP, J.R.; NEFF, J.M. Effects of the duration of exposure to mercuric chloride on the  
embryogenesis of the estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*. **Mar. Environ. Res.**,  
Barking, v.3, p.195-213, 1980.
- SHAW, R.W. Acid precipitation in Athantic Canada. **Environ. Sci. Technol.**,  
Washington, v.13, n.4, p.406-411, 1979.
- SHEPHARD, K.L. Studies on the fish-gill microclimate: interactions between gill tissue,  
mucus and water quality. **Environ. Biol. Fish.**, Dordrecht, v.34, p.409-420, 1992.
- SILVA, H.C.; MEDINA, H.G.S.; FANTA, E.; BACILA, M. Sublethal effects of the  
organophosphate Folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces,  
Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.105C, n.2, p.197-201, 1993.
- SINOVCIC, G. GUTIERREZ, M.; ESTABLIER,R. On the accumulation of mercury in  
the blood, liver, spleen and kidney of *Halobatrachus didactylus* Schneider and  
resulting haematologic, cytoloematologic and histopathologic alterations. **Acta.**  
**Adriat.** Split,v.21, n.1, p.219-225, 1980.

- SKAK, C.; BAATRUP, E. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methylmercury and dissolved mercuric chloride. **Aquat. Toxicol. (Amst.)**, v.25, p.55-70, 1993.
- SMITH, R.J.F.; LAWRENCE, B.J. Effects of acute exposure to acidified water on the behavioral. Response of fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance (Schreckstoff). **Environ. Toxicol. Chem.**, Emsford, v.7, p.329-335, 1988.
- SNARSKI, V.M.; OLSON, G.F. Chronic toxicity and bioaccumulation of mercuric chloride in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) **Aquat. Toxicol.**, New York, v.2, p.143-156, 1982.
- SPINELLI, J.; STEINBERG, M.A.; MILLER, R.; HALL, A.; LEHMAN, L. Reduction of mercury with cysteine in comminuted halibut and hake fish protein concentrate. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.21, n.2, p.264-268, 1973.
- SPRENGER, M.D.; McINTOSH, A.W.; HOENIG, S. Concentrations of trace elements in yellow perch (*Perca flavences*) from six acidic lakes. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.37, p.375-388, 1988.
- STARY, J.; KRATZER, K.; HAVLIK, B.; PRASILOVA, J. The cumulation of methylmercury in fish (*Poecilia reticulata*). **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, London, v.8, p.189-195, 1980.
- STEFFAN, R.J.; KORTHALS, E.T.; WINFREY, M.R. Effects of acidification on mercury methylation, demethylation, and volatilization in sediments from an acid-susceptible lake. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, n.8, p.2003-2009,

1988.

STERBA, G. **Süßwasserfische aus aller welt**. Berchtesgarden: Zimmer & Hergoz, 1959.

STINSON, C.M.; MALLATT, J. Branchial ion fluxes and toxicant extraction efficiency in lamprey (*Petromyzon marinus*) exposed to methylmercury. **Aquat. Toxicol.( Amst.)**, v.15, p.237-252, 1989.

STOCK. A.; JAENSCH, E. Nothing new under the sun. **Orthomolecular Psychiatry**, v.12, n.3, p.202-207, 1983.

STOFELLA, D.R.E. **Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (teleostei), estudada através da Microscopia Eletrônica de Varredura**. Curitiba, 1994. 125p. Tese (Doutor em Zoologia) Universidade Federal do Paraná.

STUDNIKA, M. Histological and ultrastructural studies of muscles, liver and kidneys of brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) after experimental contamination with mercury. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**. v.13, n.1, p.99-122, 1984.

TAM, W. H.; FRYER, J.N.; ALI,I.; DALLAIE, M.R.; VALENTINE, B. Growth inhibition, gluconeogenesis, and morphometric studies of the pituitary and interrenal cells of acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.45, p.1197-1211, 1988.

THOMAS, P.; WOFFORD, F.W. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L. ). **Toxicol. Appl. Pharmacol.** , Duluth,v.76, n.1, p.172-182, 1984.

- THOMAS, S.; HUGHES, G.M. Effects of hypoxia on blood gas and acid-base parameters of sea bass. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.53, n.6, p.1336-1341, 1982.
- THURBERG, F.P.; COLLIER, R.S. Respiratory response of cunners to silver. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.8, n.2, p.40-41, 1977.
- THURBERG, F.P.; DAWSON, M.A. Physiological response of the cunner, *Tautoglabrus adspersus*, to cadmium. III. Changes in osmoregulation and oxygen consumption. **NOAA Tech. Rep. NMFS**, Washington, p.11-13, 1974.
- TOLLEFSON, L.; CORDLE, F. Methylmercury in fish: a review of residue levels, fish consumption and regulatory action in the United States. **Environ. Health Perspect.**, Washington, v.68, p.203-208, 1986.
- TSUBAKI, T.; IRUKAYAMA, K. **Minamata disease: methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan.** Tokyo: Kodansha Ltda, 1977. p.288-310.
- ULTSCH, G.R.; GROSS, G. Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in O<sub>2</sub> uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.62A, p.685-689, 1979.
- VARANASI, U.; ROBISCH, P.A.; MALINS, D.C. Structural alterations in fish epidermal mucus produced by water-borne lead and mercury. **Nature (Lond.)**, v.258, n.4, p.431-432, 1975.
- VERMA, S.R.; CHAND, R.; TONK, I.P. Effects of environmental and biological variables on the toxicity of mercury chloride, **Environ. Pollut. Ser. A. Ecol. Biol.**, Barking, v.33, n.3, p.243-248, 1984.

- VIENER, J. G.; FITZGERALD, W. F.; WATRAS, C. J.; RADA, R. G. Partitioning and bioavailability of mercury in an experimentally acidified Wisconsin Lake. **Environ. Toxicol. Chem.**, Emsford, v.9, p.909-918, 1990.
- WAKABAYASHI, M.; KIKUCHI, M.; OH, Y.K.; YOSHIDA, T.; KOJIMA, H.; SAITO, H. Bioconcentration of  $^{203}\text{HgCl}_2$  in rainbow trout and carp at low concentrations. **Bull. JPN. Soc. Sci. Fish.**, Minato, v.53, n.5, p.841-845, 1987.
- WALKER, R.L.; WOOD, C.M.; BERGMAN, H.L. Effects of low pH and aluminum on ventilation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Can. J. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.45, p.1614-1622, 1988.
- WALSH, P.I.; MOMMSEN, T.P.; MOON, T.W.; PERRY, S.F. Effects of acid-base variables on in vitro hepatic metabolism in rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v.135, p.231-241, 1988.
- WEIS, P. Metallothionein and mercury tolerance in the killfish, *Fundulus heteroclitus*. **Mar. Environ. Res.**, Barking, v.14, p.153-166, 1984.
- WESTFALL, B.A. Coagulation film anoxia in fishes. **Ecol.**, Carlton, v.266, n.3, p.283-287, 1945.
- WHITEHEAD, C.; BROWN, J.A. Endocrine responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to acid, aluminium and lime dosing in a Welsh Hill Stream. **J. Fish. Biol.** London, v.35, p.59-71, 1989.
- WHO (1991). Inorganic Mercury Environmental Health Criteria II (IPCS). **World Health Organization**. Geneva.

- WIEBE, A.H.; McGAVOCK, A.M.; FULLER, A.C.; MARKUS, H.C. The ability of freshwater fish to extract oxygen at different hydrogen-ion concentrations. **Physiol. Zool.**, Chicago, v.7, n.3, p.435-448, 1984.
- WIENER, J.G.; MARTINI, R.E.; SHEFFY, T.B.; GLASS, G.E. Factors influencing mercury concentrations in walleyes in Northern Wisconsin Lakes. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v.119, p.862-870, 1990.
- WILKINSON, D.J.; POST, M.A.; VENGLARIK, C.; CHANG, D.; DAWSON, D.C. Mercury blockade of thiazide-sensitive NaCl cotransport in flounder urinary bladder. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v.123, p.170-176, 1993.
- WISNIEWSKI, J.; KEITZ, E. Acid rain deposition patterns in the continental United States. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.19, p.327-339, 1983.
- WOBESER, G. Acute toxicity of methyl mercury chloride and mercuric chloride for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry and fingerlings. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v.32, p.2005-2013, 1975b.
- WOBESER, G. Prolonged oral administration of methylmercury chloride to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. **J. Fish. Res. Board Can.**, Ottawa, v.32, p.2015-2023, 1975a.
- WREN, C.D.; MacCRIMMON, H. R. Mercury levels in the sunfish, *Lepomis gibbosus*, relative to pH and other environmental variables of Precambrian shield lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.40, p. 1737-1744, 1983.
- WREN, C.D.; SCHEIDER, W.A.; WALES, D.L.; MUNCASTER, B.W.; GRAY, I.M.

Relation between mercury concentrations in walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*) and Northern Pike (*Esox lucis*) in Ontario Lakes and influence of environmental factors. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.48, p.132-139, 1991.

WREN, C.D.; STOCKS, P.M.; FISHER, K.L. Mercury levels in Ontario Mink and otter relative to food levels and environmental acidification. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.64, p.2854-2859, 1986.

WREN, C.D.; STOKES, P.M. Depressed mercury levels in biota from acid and metal stressed lakes near Sudbury, Ontario. **Ambio**, Oxford, v.17, n.1, p.28-30, 1988.

XUN, L.; CAMPBELL, N.E.R.; RUDD, J.W.M. Measurements of specific rates of net methylmercury production in the water column and surface sediments of acidified and circumneutral lakes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v.44, p.750-757, 1987.

ZUCHELKOWSKI, E.M.; PINKSTAFF, C.A.; HINTON, D.E. Mucosubstance histochemistry in control and acid stressed epidermis of brown bullhead catfish *Ictalurus nebulosus* (LeSueur). **Anat rec.**, New York, v.212, p.327-335, 1985.