

**Estudo investigativo da bioindicação para o peixe *phalloceros caudimaculatus* (guaruzinho, barrigudinho) em cobre****3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente****Pedro José Sanches Filho¹, Francisco Osvaldo Peres Pereira²**¹ Instituto Federal Sul Rio Grandense (pjSans@ibest.com.br)² Instituto Federal Sul Rio Grandense (frangian@terra.com.br)**Resumo**

Em águas naturais os metais pesados surgem devido ao despejo dos resíduos industriais de vários tipos, as quais se disseminam na periferia das grandes urbes. Neste estudo foi utilizado o peixe *Phalloceros caudimaculatus* como bioindicador, para a avaliação dos impactos ambientais decorrentes da poluição por metais pesados em seu habitat. Foi investigado o fenômeno bioacumulação e da toxicidade aguda para encontrar o valor da CL50 96h, do espécime em estudo. Para o teste de bioacumulação foi estudado o cobre como metal acumulativo e para o de toxicidade foi empregado o reagente cloreto de cobre II. Os guaruzinhos analisados foram recolhidos em córregos urbanos da cidade de Pelotas/RS. No laboratório os exemplares foram postos em aquário para sua adaptação e procriação. No experimento da bioindicação, foram utilizados 3 aquários com 75 peixes, 1 aquário padrão e 2 com concentração de contaminantes acima dos padrões de potabilidade definido pela Portaria 1.469 do Ministério da Saúde, os indivíduos ficaram alguns dias confinados. O ensaio da CL50 foi realizado em triplicata com 144 exemplares para a toxicidade aguda. O espécime se mostrou resistente e adequado ao fenômeno da bioacumulação, fatores como concentração e tempo de confinamento dos indivíduos em ambiente adverso foram importantes levando ao um enriquecimento dos metais nas amostras, nos ensaios de toxicidade aguda para a CL50 96h no guaruzinho foi de 19,33 mg L⁻¹ de cobre, os parâmetros, tais como pH, condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura e dureza foram registrados. As mudanças comportamentais nos peixes foram observadas e registrado.

Palavras-chave: *Phalloceros caudimaculatus*, Bioindicação, Cobre

Área Temática: Impactos Ambientais

Abstract

*In natural waters heavy metals arise due to the dumping of industrial wastes of various kinds, which spread on the outskirts of big city. This study used the fish *Phalloceros caudimaculatus* as a bioindicator for the assessment of environmental impacts of heavy metal pollution in their habitat. We investigated the phenomenon bioacumulação and acute toxicity to find the value of 96h LC50, the specimen under study. For the test of bioaccumulation was studied as copper metal and the cumulative toxicity of the reagent was used copper II chloride. The guaruzinho analyzed were collected from urban streams of the city of Pelotas/RS. In the laboratory the samples were placed in an aquarium for their adaptation and breeding. In the experiment of bioindication, we used three tanks with 75 fish, an aquarium with two standard and concentration of contaminants above the potability standards set by Ordinance 1469 of the Health Ministry, the subjects were confined to a few days. The LC50 test was performed in triplicate with 144 copies for acute toxicity. The specimen proved to be durable and adequate to the phenomenon of bioaccumulation factors such as concentration and time of confinement of individuals were important in harsh environmental conditions leading to an enrichment*



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

of metals in the samples, in acute toxicity tests for the guaruzinho 96h LC50 was 19, 33 mg L⁻¹ of copper, parameters such as pH, conductivity, dissolved oxygen, temperature and hardness were recorded. The behavioral changes in fish were observed and recorded.

Key words: *Phalloceros caudimaculatus, Bioindication, Copper*

Theme Area: Environmental Impacts



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

1 Introdução

Este trabalho tem por escopo a utilização de uma espécie amplamente distribuída em diferentes ambientes aquáticos e bastante resistentes, o barrigudinho cujo nome científico é *Phalloceros caudimaculatus*. Observando-se que nada foi encontrado na bibliografia referente ao uso deste organismo como bioindicador da contaminação por metais pesados.

Para este propósito, os mais adequados são os peixes, assim como os mamíferos, pois sofrem bioacumulação, respondem a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o citocromo P450 (enzima responsável pelo metabolismo oxidativo de compostos lipofílicos de origem endógena ou exógena como hormônios esteróides ou poluentes ambientais), em resposta a poluentes (GOKSOYR *et al.*, 1991; ABNT, 2003b e ABNT, 2004c).

No caso de ensaios com substâncias mutagênicas presentes na água ou em sedimentos, estes podem ser realizados em condições laboratoriais com o uso de vários tipos de animais como, por exemplo, anfíbios, moluscos e peixes, os quais servirão como bioindicadores da poluição do meio aquático (MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996).

No entanto, deve-se ressaltar que devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobiótico, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Também se deve considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie estudada bem como a efeitos sinérgicos ou antagônicos com outras substâncias disponíveis no meio (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991 e FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2008).

Portanto, a utilização de animais como bioindicadores é extremamente útil, especialmente para a avaliação de impactos ambientais decorrentes de descargas de poluentes em biota aquática (IBAMA, 1987). Os bioindicadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo.

2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com o peixe *Phalloceros caudimaculatus*. Os peixes foram coletados com uma rede de mergulho feita de cetim, em córregos urbanos localizados no bairro Laranjal na cidade de Pelotas do estado do Rio Grande do Sul, após a coleta os corpos teste foram postos em um recipiente contendo a água do córrego até sua ida ao laboratório de química do IFSul, onde se localiza o GPCA (Grupo de Pesquisa em Contaminantes Ambientais). No laboratório os peixes foram confinados em aquários de 30L em boas condições conforme as recomendações do (IBAMA, 1987) com bomba de oxigênio, termostato com aquecedor regulado a 27°C e pH regulado entre 8,0~5,0, para sua adaptação e procriação.

Os testes de toxicidade aguda foram realizados em triplicata, com cloreto de cobre II, em ambiente estático, sem substituição e sifonagem da água, com duração de 96 horas e sem alimentação (ABNT, 1993). Para esses testes, os peixes ficaram em confinamento em ambiente adequado por cerca de um a dois meses para sua recuperação, após esse período os corpos testes foram separados em 6 grupos, com 8 indivíduos cada, um grupo padrão, sem



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

contaminante, e 5 grupos com concentrações de contaminante diferentes de forma crescente com 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} e 30 mg L^{-1} .

Os corpos teste foram posto em recipiente com capacidade de 4 L, contendo 8 indivíduos em cada recipiente, onde ficaram 24 horas em adaptação em águas com dureza total de 40 mg L^{-1} de CaCO_3 , oxigênio dissolvido entre 7,5 e 7,0, pH variando entre 7,10 e 6,90 e condutividade de 165,5 a 181,2 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (GEORGETTI, 2010). Após essa adaptação os recipientes foram contaminados e passaram por 96 horas em teste. A cada 24 horas de teste, os indivíduos mortos eram quantificados e retirados do recipiente e os parâmetros eram quantificados e apontados. Para a análise estatística da CL50 foi utilizado o "Método Behrens-Karber" com a fórmula (KLASSEN, 1991).

Para a avaliação da bioacumulação foram utilizados 3 aquários com cerca de 25 corpos testes em cada aquário, um aquário padrão e dois aquários com contaminação de dicromato de potássio acima dos padrões de potabilidade definidos pela Portaria 1.469, de 29/12/2000, do Ministério da Saúde que são $0,02\text{ mg L}^{-1}$ de cobre. O primeiro aquário foi contaminado em dobro dos padrões com $0,035\text{ mg L}^{-1}$ de cromo passando por um período confinado em cerca de 3 meses. Para o segundo aquário a contaminação ocorreu em 4 vezes acima dos padrões de potabilidade com $0,07\text{ mg L}^{-1}$ de como hexavalente onde passou por cerca de 1 mês e 15 dias em ambiente contaminado. Já para o aquário padrão os peixes ficaram cerca de 3 meses confinados.

Após esses períodos de confinamentos, os indivíduos foram mortos e tiveram de ser submetidos ao método (DURAL, 2006) de digestão da massa corporal, onde foram secos em estufa a 105°C até peso constante, após as amostras secarem, foram pesadas $0,5\text{ g}$ de massa seca e posto em tubos de ensaio para serem digeridos com uma mistura de HNO_3 concentrado e HClO_4 (2:1 v/v), aquecida a 60°C por 12 horas. Para a determinação quantitativa dos metais nas amostras das águas e dos peixes, foi realizada por ICP-OES, com equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Optima 3300, utilizando argônio como gás inerte.

3 Resultos e Discussão

Os testes de toxicidade aguda foram feitos em triplicata, obtendo os seguintes CL 50 de resultados: no primeiro teste chegou-se a $19,75\text{ mg L}^{-1}$, o segundo foi de $18,90\text{ mg L}^{-1}$ e o ultimo teste chegou a $19,34\text{ mg L}^{-1}$. A CL50 96h média no guaruzinho foi de $19,33\text{ mg/l}$ de cobre, tendo uma RSD de 13,33%. No recipiente padrão não houve mortalidade. No recipiente com concentração de 5 mg L^{-1} a mortalidade variou entre 0,0 % e 37,5 % dos indivíduos. Em 10 mg L^{-1} a mortalidade alterou entre 25,0 % e 50,0 %. Em 20 mg L^{-1} variou entre 37,5 % e 50,0 %; em 25 mg L^{-1} variou-se entre 50,0 % e 62,5 % e no de 30 mg L^{-1} obteve uma mortalidade de 100% dos indivíduos em exposição. Os resultados obtidos nos testes foram similar ao alcançado no (BOOCK, 2005).

Os parâmetros das águas se mostraram homogêneos nos testes, onde o oxigênio dissolvido variou-se entre 7,5 e 5,3, o oxigênio dissolvido foi decrescendo com o passar das 96 horas, onde foi constatado que os grupos que sobreviveram mais exemplares foram os grupos que tiveram o menor oxigênio dissolvido.

A dureza é um parâmetro que para ser medido deve-se retirar um volume da amostra, não foi possível fazer essa análise durante o ensaio, pois acabaria modificando o volume final. Mas a dureza foi analisada antes da adaptação dos peixes na água descontaminada e após as 96h em águas contaminadas, onde o resultado mostrou que não se alterou significativamente a dureza que esteve entre 40 e 45.

O pH foi um quesito a parte, pois quanto maior a concentração do metal mais baixo é o pH, mas com o passar das 96h o pH foi subindo, devido a concentração de matéria orgânica



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

eliminada pelos peixes, variou entre 5,10 à 7,50.

A temperatura sempre esteve entre 19,5 a 22,7 °C, mostrando que não houve interferência com os fatores dos testes, mas sim com fatores externos, o clima.

A condutância da água alternou entre os valores de 220,4 a 260,1 $\mu\text{s cm}^{-1}$. A condutividade da água não foi constante durante o experimento, mostrou que quanto maior a concentração de metal, maior será sua condutância devido ao aumento de sólidos dissolvidos.

Os peixes que foram expostos as maiores concentrações mostraram mudanças comportamentais observadas como, o nado desequilibrado, próximo à superfície e batimento opercular elevado. Já os de menor concentração de metal demonstraram o mesmo comportamento mas ficaram mais ao fundo dos recipiente. Todos os peixes apresentaram um alto índice de estresse.

O ensaio da bioacumulação, foram feito com três grupos, o primeiro grupo ficou confinado cerca de 3 meses em aquário com $0,35 \text{ mg L}^{-1}$, o dobro de contaminação dos padrões de potabilidade definidos pela Portaria 1.469. Onde as amostras mostraram um acumulo de $30,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de cromo.

O segundo grupo foi exposto ao um período aproximadamente de 1 mês e 15 dias com concentração de 4 vezes acima dos padrões com $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, mostrando um enriquecimento das amostras digeridas em $31,7 \text{ mg kg}^{-1}$ do metal analisado.

Para o grupo padrão, onde não houve contaminação do metal, os exemplares ficaram confinados durante 3 meses. Na analise dos peixes digeridos foi de $2,4 \text{ mg kg}^{-1}$, essa concentra pode-se explicar pela possível acumulo do metal em seu habitat natural, os córregos urbanos que é possível a existência de metais devido a ações antrópicas.

4 Conclusão

Por conseguinte, a partir do bom embasamento teórico e metodológico desse estudo, e a multiplicidade dos testes é conclusivo afirmar que o desenvolvimento das experiências com os peixes *Phalloceros caudimaculatus* alcançou um excelente desempenho e resultados conclusivos, considerando importante a utilização destes corpos teste como bioindicador de contaminação, mostrando-se um espécime adequado para o fenômeno da bioacumulação e sendo excelente para resistência no teste de toxicidade aguda.

5 Agradecimento

Ao PIBIT da CNPq pelo auxilio financeiro. A coordenadoria de química do IFSul pelas instalações e ao GPCA pelo equipamento e todo apoio necessário para a realização do trabalho.

Referências

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – (2003b) Projeto 00:001.44-001 – **Ecotoxicologia aquática** – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 15p.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – (2004c) **Ecotoxicologia aquática** – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 17p.



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – (1993) NBR 12715 – Água, Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes. Parte I – Sistema Estático. Rio de Janeiro.

ASHISH K. Mishra and Banalata Mohanty. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Volume 26, Issue 2, September 2008, Pages 136-141

BOOCK M. V. 1 e MACHADO J. G. N. 2- , (2005) ESTUDOS SOBRE A TOXICIDADE AGUDA DO OXICLORETO DE COBRE PARA O PEIXE *Poecilia reticulata* *

CRUZ C. DA, P. CUBO, GOMES G. R., VENTURINI F. P., GUILHERME P. E. & PITELLI R. A. 2008. Sensibilidade de Peixes Neotropicais ao Dicromato de Potássio. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 3, n. 1, 2008, 53-55 p.

DURAL, M.; Göksu, M.Z.L. & Özak, A.A. 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food Chemistry**. 102: 415-421.

FRENZILI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. (2008). The Comet Assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**. Article in press (MUTREV-7886), 13p.

GEORGETTI, M. S., 2010 **Avaliação química e ecotoxicológica de efluentes químicos, visandando seu reuso**. São Carlos 168 p.

GOKSOYR, A. et al. (1991). Immunochemical cross-reactivity os β -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in Liver Microsomes from Different Fish Species and Rat. **Fish Physiologi**. v. 9, p. 1-13

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação da toxicidade aguda para *Daphnia similis***. In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, 14p., 1987.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes**. In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, p.20-32, 1987.

KLASSEN, C.D., 1991. **Principles of toxicology**. In: Gilman, A.G., Tall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (Eds.), Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. McGraw Hill, pp. 49–61.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. (1996). Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from Two Natural Enviroments: a Bioassay for the in Situ Detection of Mutagens in Freshwater. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 367, p. 245-251.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. (Republicada no DO nº 38 - E de 22/2/2001, Seção 1, pág. 39)



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.). (1991).
Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética.