

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DE SÃO PAULO

UTILIZAÇÃO DO  $^{65}\text{Zn}$  COMO ELEMENTO TRAÇADOR NO  
ESTUDO DA BIOACUMULAÇÃO DO ZINCO POR  
ORGANISMOS AQUÁTICOS

WALDIR MALAGRINO

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre em Tecnologia Nuclear

Orientadora: Dra. Barbara Paci Mazzilli

São Paulo

1992

## AGRADECIMENTOS

- À Dra. Barbara Paci Mazzilli pela orientação e pelo incentivo durante a elaboração desta dissertação, contribuindo de maneira decisiva para a minha formação científica.

- Ao Prof. Dr. Aristides Almeida Rocha, pela constante presença e apoio no transcorrer desta pesquisa, contribuindo de forma decisiva com preciosas sugestões.

-- Aos colegas da Divisão de Radioquímica pela colaboração no transcorrer deste trabalho e pela utilização dos laboratórios, sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa dos estudos.

- À Maria do Carmo Costa Falcão e Antonio Soares Gouvea pela orientação na análise estatística dos resultados.

- À Barbara, Konrad, Andreas, Claudia e Peter pela inestimável ajuda e incentivo que tornou possível a realização desta pesquisa.

- Ao técnico Gerson Palletti (TFR).

-- Ao tecnólogo Marcelo Francis Maduar (NPA).



Aos meus pais

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Zinco na água e em peixes (nas vísceras e na musculatura). Represa Billings - campanhas 1975-1983 - Dados medianos .....	12
Tabela 1.2. Concentração de zinco na água, sedimento e peixes em diferentes localidades do Brasil .....	13
Tabela 1.3. Concentração de zinco na água, sedimentos e peixes no Estuário e Baía de Santos (Campanhas de 1984-1987) .....	14
Tabela 1.4. Teores de zinco em água, sedimento e folhas das plantas de mangue da Baixada Santista .....	15
Tabela 1.5. Resultados obtidos por pesquisadores que utilizaram a técnica de traçadores radioativos em estudos de absorção e eliminação de radionuclídeos de centros de pesquisa, centrais nucleares e do "fall-out" .....	29
Tabela 4.1. Qualidade da água do local de coleta (janeiro, junho, outubro e dezembro de 1986) .....	52
Tabela 4.2. Valores do fator de concentração <sup>(*)</sup> para peixes fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). (*): média de 10 determinações .....	55
Tabela 4.3. Valores do fator de concentração <sup>(*)</sup> do zinco-65 para peixes machos da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). (*): média de 10 determinações .....	57

Tabela 4.4. Valores do fator de concentração <sup>(*)</sup> do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas).	
(*) média de 15 determinações .....	64
Tabela 4.5. Eliminação do zinco-65 após 96 horas de acumulação da água para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo. Cada ponto representa a média de 20 determinações .....	68
Tabela 4.6. Valores do fator de concentração do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (18 dias). Cada ponto representa a média de 30 determinações .....	73
Tabela 4.7. Eliminação de zinco-65 após 18 dias de acumulação da água para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo. Cada ponto representa a média de 30 determinações .....	77
Tabela 4.8. Valores do fator de concentração do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (30 dias). Cada ponto representa a média de 24 determinações .....	81
Tabela 4.9. Eliminação do zinco-65 após 30 dias de acumulação da água para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo. Cada ponto representa a média de 24 determinações .....	85

## LISTA DE FIGURAS

Quadro 1.1. Fontes de lançamento de resíduos contendo apreciáveis quantidades de zinco .....	11
Figura 3.1. Tanque de manutenção com filtro biológico e termostato para aclimação dos organismos .....	40
Figura 3.2. Espectro de raios gama da solução de zinco radioativo ..	44
Figura 3.3. Vista geral da caixa térmica onde foram realizados os testes de bioacumulação .....	46
Figura 3.4. Bateria de aquários utilizados para separação e triagem dos organismos para os experimentos .....	47
Figura 4.1. Fator de concentração do zinco-65 para peixes fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 10 indivíduos ..	56
Figura 4.2. Fator de concentração do zinco-65 para peixes machos da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 10 indivíduos ..	58
Figura 4.3. Fator de concentração do zinco-65 para peixes machos e fêmeas (separados) da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 10 indivíduos .....	59
Figura 4.4. Fator de concentração do zinco-65 para peixes fêmeas da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 15 indivíduos ..	65

Figura 4.5. Eliminação do zinco-65 para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo, após 96 horas de acumulação da água .....	69
Figura 4.6. Fator de concentração do zinco-65 para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (18 dias). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 30 determinações .....	74
Figura 4.7. Eliminação do zinco-65 para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo, após 18 dias de acumulação da água .....	78
Figura 4.8. Fator de concentração do zinco-65 para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo de exposição (30 dias). Cada ponto e barra vertical representa a média de 24 indivíduos .....	82
Figura 4.9. Eliminação do zinco-65 para peixes da espécie <u>Poecilia reticulata</u> em função do tempo, após 30 dias de acumulação da água .....	86

Utilização do  $^{65}\text{Zn}$  como elemento traçador no estudo da bioacumulação do zinco por organismos aquáticos.

WALDIR MALAGRINO

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo primordial ressaltar a importância do uso de traçadores radioativos, bem como estabelecer metodologia para a utilização do  $^{65}\text{Zn}$  no estudo de bioacumulação do zinco através de ensaios biológicos.

Para os ensaios do tipo estático foram utilizados peixes "Lerbistes", Poecilia reticulata, e o período de exposição desses organismos variou de 5 dias (experimentos de curta duração) a 30 dias (experimentos de longa duração).

Nestes ensaios acompanhou-se a absorção de zinco da água bem como a eliminação do metal previamente incorporado, por meio da medida da atividade do traçador de  $^{65}\text{Zn}$  previamente adicionado. A técnica utilizada permite acompanhar o comportamento do zinco estável uma vez que o isótopo radioativo utilizado é um isótopo do mesmo elemento e apresenta propriedades químicas semelhantes.

O radionuclídeo utilizado ( $^{65}\text{Zn}$ ) foi obtido por irradiação de zinco no Reator IEA-R1, sob um fluxo de nêutrons da ordem de  $10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , durante 240 horas.

O  $^{65}\text{Zn}$  formado (meia-vida de 245 dias) foi dissolvido convenientemente e a solução resultante adicionada aos recipientes para a realização dos testes.

Determinou-se então a absorção e a eliminação do zinco pelos peixes da espécie Poecilia reticulata pela medida da atividade presente no peixe no decorrer dos experimentos, utilizando para tanto detectores de NaI(Tl) acoplados a analisadores monocanal.

Os resultados obtidos indicam que a absorção e eliminação do zinco pela espécie Poecilia reticulata é cumulativa, sendo necessários 30 dias para uma eliminação de 70% do zinco previamente absorvido.

Os resultados obtidos são relevantes se considerarmos que os dados encontrados na literatura sobre a bioacumulação do zinco pela fauna ictica brasileira são escassos. Além do mais, como esta espécie ocupa posição relevante na cadeia alimentar, os resultados obtidos podem servir como subsídios no estudo do risco potencial da bioacumulação deste elemento na fauna piscícola em níveis tróficos superiores e em última instância no homem, que é o elo final da cadeia alimentar.

Use of  $^{65}\text{Zn}$  as a radioactive tracer in the bioaccumulation study of zinc by aquatic organisms.

WALDIR MALAGRINO

ABSTRACT

The present work has as main objective to emphasize the importance of using radioactive tracers as well as to establish a methodology for the utilization of  $^{65}\text{Zn}$  in the bioaccumulation study of zinc by Poecilia reticulata. The exposure time varied from 5 days (short term experiments) to 30 days (long term experiments).

The bioaccumulation of zinc from the water as well as the elimination of the metal previously absorbed were determined by measuring the activity of  $^{65}\text{Zn}$  which was added to the water in the beginning of the experiments.

The technique chosen is suitable to study the behaviour of the stable zinc since the radionuclide used is an isotope of the same element and therefore presents the same chemical properties.

The radionuclide was obtained by irradiation of zinc in the research reactor IEA-R1, at a neutron flux of  $10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , during 240 hours.

The  $^{65}\text{Zn}$  formed (half life of 245 days) was conveniently dissolved and the final solution added to the water used in the experiments. The absorption and elimination of  $^{65}\text{Zn}$  by the species Poecilia reticulata were then determined by measuring the activity present in the fish during the experiments by using a NaI(Tl) detector coupled to a monochannel analyzer.

The results obtained show that the absorption and elimination of zinc by Poecilia reticulata is slow, 30 days being necessary for the elimination of 70% of the previously absorbed zinc.

The results are of main concern if it is considered that the literature about bioaccumulation of zinc by the Brazilian ichthyofauna is scarce. Furthermore the species Poecilia reticulata is part of the food chain and the results can be used in the evaluation of the potential risk of the zinc bioaccumulation by fishes of higher trophic levels and by men who are the final link of the food chain.

UTILIZAÇÃO DO <sup>65</sup>Zn COMO ELEMENTO TRACADOR NO ESTUDO DA  
BIOACUMULAÇÃO DO ZINCO POR ORGANISMOS AQUÁTICOS

1. INTRODUÇÃO

A idéia de poluição ambiental abrange uma série de aspectos, que vão desde a contaminação do ar, das águas e do solo, a transformação da paisagem, erosão de monumentos e construções até a contaminação de alimentos que comprometem a saúde ou mesmo a sobrevivência do homem.

Segundo Felenberg (1980), duas causas podem ser apontadas: a industrialização que durante a transformação de matérias primas forma quantidades apreciáveis de resíduos inertes ou tóxicos que comprometem o ambiente e o aumento populacional que tende a aumentar a produção de alimentos, forçando o desenvolvimento de terras cultiváveis, que não crescem no mesmo ritmo da população, sendo necessária uma produção de fertilizantes e defensivos agrícolas.

O problema da poluição industrial tem despertado a atenção de grande parte dos técnicos da área de saneamento ambiental em todo o mundo. Genericamente, poluição pode ser definida como "qualquer descarga de resíduos ou mesmo mudanças no ambiente natural que sejam diretamente nocivas ao homem" (Sewell, 1978). Segundo o mesmo autor, a poluição consiste em uma alteração indesejável nas características físicas, químicas e biológicas do nosso ar, solo, água que podem ou não afetar adversamente a vida humana.

A maioria dos grandes centros urbanos, principalmente no Brasil, apresenta um crescimento industrial fora de qualquer planejamento, sendo a região metropolitana de São Paulo um exemplo

típico desta situação. Os efeitos da poluição industrial fazem-se sentir nos seres vivos (homem, animais, plantas e decompositores), através da respiração, absorção da pele, ingestão de água ou alimentos.

De acordo com Greenberg (1978), a forma mais grave de poluição hídrica na atualidade é a química.

A partir da II Guerra Mundial, a indústria química conheceu enorme expansão com a chamada "revolução dos sintéticos" liderada pelos países desenvolvidos, especialmente E.U.A.. Estima-se que cerca de 500 novos produtos químicos sintéticos surjam anualmente no mercado, desconhecendo-se, na maioria dos casos, quais poderiam ser seus efeitos sobre os seres vivos a longo prazo. Experimentos conduzidos em laboratório por Malagrino e colaboradores (1985, 1987a e 1987b) utilizando moluscos provenientes do Litoral Norte de São Paulo, permitem concluir que concentrações de detergentes biodegradáveis que segundo os padrões inseridos na legislação estariam adequados à sobrevivência de organismos aquáticos, causam anomalias no bisco de fixação, na atividade de escavação, bem como letalidade mesmo quando esses animais eram transferidos para a água limpa.

Sabemos atualmente que alguns metais, especialmente os pesados, tais como mercúrio, arsênio, bário, cádmio, cobre, chumbo, molibdênio, platina e zinco têm efeitos maléficos sobre o corpo humano.

Por outro lado, um número considerável de elementos metálicos pode ser encontrado praticamente em todos os organismos. Desses elementos, 14 marcam presença em baixas concentrações ou em nível de traços e são considerados nutrientes essenciais nos processos biológicos. Com certeza uma concentração mais alta ou mais baixa de

qualquer elemento em relação aos níveis fisiológicos pode, ao longo do tempo, provocar um estado de toxidez ou de deficiência.

Resíduos industriais contendo tais elementos fatalmente geram problemas a curto e a longo prazo, tornando-se difícil, no último caso, associar os males detectados na população em uma determinada época, ao poluente que foi liberado muito tempo antes.

Episódios de efeitos retardados com poluentes industriais são notórios. Um deles é o caso de Minamata, no Japão, onde durante muitos anos lançou-se águas residuárias, contendo mercúrio inorgânico na época considerado inofensivo, na baía do mesmo nome. Na década de 1950 surgiram casos de doenças neurológicas, que levaram à paralisia e à morte. Ficou provado cientificamente por Jensen e Jernelov (1972) que microorganismos aquáticos transformam o mercúrio inorgânico em sua forma orgânica, o metilmercúrio, extremamente tóxico.

Os metais pesados, denominação genérica de uma série de elementos que ocupam as colunas centrais da classificação periódica, podem ter propriedades tóxicas, tanto no estado elementar como quando combinados.

A acumulação e persistência de alguns metais é problema global, não estando isolado e nem confinado a áreas costeiras, sendo portanto imperioso analisar o perigo representado, sobretudo quando esses metais revelam afinidades com moléculas orgânicas biológicas.

Há casos em que um metal não essencial toma o lugar de outro necessário ao organismo; outros são indispensáveis ao organismo biológico, entretanto basta uma pequena elevação para se tornarem tóxicos.

Esses metais são introduzidos nos corpos hídricos através

dentre outros, de efluentes de indústrias de material elétrico, químicas e farmacêuticas, por meio de resíduos de mineração, de indústrias de papel, de cosméticos, de portos de minérios, etc.

São também introduzidos metais pesados como o níquel, o cobalto, o manganês e o vanádio em decorrência da poluição pelo petróleo, além de certos tipos de agrotóxicos, especialmente os empregados contra fungos que possuem metais como mercúrio, zinco e cobre (Tommasi, 1976).

Espumas de detergentes formadas em rios e reservatórios podem além de albergar bactérias e fungos conter metais pesados, tais como cádmio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco (Castro e colaboradores, 1979).

Além desse ingresso direto de poluentes que é de primordial importância para os ecossistemas, sobretudo em áreas costeiras, o transporte atmosférico carrega grandes quantidades de metais provenientes das áreas metropolitanas (Idoe, 1972).

Substâncias orgânicas ou minerais podem inibir as atividades biológicas dos sistemas de tratamento de esgotos, criando problemas operacionais durante o processo de depuração.

Com relação ao tratamento anaeróbico, os metais pesados, entre outros inibidores, apresentam efeitos nefastos sobre as bactérias responsáveis por esse processo de estabilização da matéria orgânica.

Experiência realizada em São Paulo, demonstrou a influência de elevadas concentrações de metais pesados na digestão anaeróbica de lodos de esgotos (Souza, 1984).

A utilização do gás de esgoto para fins automotivos é um exemplo. Conforme foi evidenciado anteriormente, a presença de inibidores provenientes de efluentes industriais pode reduzir a

produção destes gases em aproximadamente 30 %.

A utilização, muito difundida, do lodo das estações de tratamento como fertilizante organomineral exige que o excesso de metais como o zinco, o cádmio, o cobre, o boro e o níquel, entre outros, não seja levado aos solos agrocoltiváveis pois estes podem causar baixo rendimento das culturas ou podem ser nocivos à saúde pela sua entrada na cadeia alimentar (Souza, 1984).

A maioria dos metais pesados são acumulados biologicamente no interior dos organismos marinhos permanecendo por longos períodos de tempo e funcionando como veneno cumulativo (SCEP, 1974). As ostras, por exemplo, podem acumular 318.000 vezes mais cádmio do que o existente na água do mar, 110.000 vezes mais zinco e 68.000 vezes mais ferro (SCEP, 1974).

Muitos desses metais são altamente tóxicos para alguns estágios de vida de grande variedade de organismos quando absorvido diretamente da água ou indiretamente através da cadeia alimentar.

No que se refere à toxicidade diferencial de metais pesados quanto às etapas de vida dos animais marinhos, cabe citar o retardo no crescimento e interferência nas fases reprodutivas mais importantes (Saliba e Krayz, 1976). Por outro lado, esses metais são acumulados via cadeia alimentar, de tal forma que os peixes, último elo dessa cadeia no sistema aquático, podem apresentar concentrações de tal ordem, que se tornam prejudiciais e tóxicos para si próprios e para os organismos que deles se alimentam, como aves aquáticas e principalmente o homem, que os utiliza como uma das fontes de proteína do seu regime alimentar.

Assim como certos metais são necessários aos processos vitais, a maioria dos organismos possui a capacidade de concentrá-los, sendo esta atividade aumentada por processos alimentares e

metabólicos, que podem levar a fatores de concentração muito elevados (Lee, 1960). Além do mais: esses mesmos metais, em baixas concentrações na água, podem ser acumulados na magnitude de mais de 1.000 vezes em certos organismos (Lee, 1960).

O problema crítico que os metais mostram com relação aos seus efeitos nos organismos aquáticos é que, tendo a capacidade de formar complexos com as substâncias orgânicas, tendem a ser fixados nos tecidos e serem excretados de forma lenta, ou seja, possuem uma meia-vida biológica longa (Waldichuk, 1974).

Para que se possa conseguir um desenvolvimento satisfatório da comunidade piscícola, é imperioso o conhecimento não unicamente dos hábitos de vida das diferentes espécies como também das características limnológicas e da qualidade da água onde deverão viver.

Metais como zinco, cobre, ferro, níquel, etc. presentes na água em concentrações acima do limite permissível seria desastroso em um tanque ou reservatório destinados ao desenvolvimento da aquicultura.

As águas destinadas ao desenvolvimento e manutenção de peixes exigem um padrão de qualidade diferente do necessário para consumo humano, que podem conter alguns metais em concentrações que não seriam permissíveis em águas destinadas à criação e desenvolvimento de peixes.

Peixes não podem dispensar a presença de oxigênio, matéria orgânica e microrganismos como alimento, e estabilidade de pH e temperatura. É de nosso conhecimento também que os parasitas específicos dos peixes só se desenvolvem quando as condições químicas e físicas do ambiente não são adequadas.

A contaminação dos ambientes naturais, provenientes do

desenvolvimento urbano e industrial, é um dos graves problemas para o desenvolvimento da aquicultura. Uma das conseqüências nefastas é a destruição da fauna dos rios e outros mananciais poluídos, não apenas por causar a morte maciça de peixes, mas também, e principalmente, pelo desaparecimento de condições propícias ao seu desenvolvimento.

### 1.1 GENERALIDADES SOBRE O ZINCO

O zinco é um metal branco azulado, com brilho específico que escurece gradualmente na presença de ar úmido como conseqüência da oxidação superficial.

Trata-se de um elemento com relativa abundância, pois constitui cerca de 0,02 % da crosta terrestre sendo cerca de 100 vezes mais abundante que o cobre.

Os principais minérios de zinco são a blenda ( $ZnS$ ), calamina ( $ZnCO_3$ ) e zincita ( $ZnO$ ), entre outros.

Este metal era quase exclusivamente obtido por via seca, pelo processo da destilação, até recentemente. Atualmente, grande parte da produção mundial provém do processo eletrolítico. Em qualquer dos casos, o minério se converte inicialmente a óxido (Gianotti, 1985).

Além do zinco ser encontrado na natureza como sulfeto, muitas vezes encontra-se associado a sulfetos de outros metais, principalmente de chumbo, cádmio, cobre e ferro.

O zinco forma complexos com uma variedade de ligantes, por exemplo, os íons de amônio e cianeto.

O sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) é tecnicamente o mais importante

sal de zinco. É produzido mediante dissolução do metal em ácido sulfúrico diluído.

O maior emprego do zinco é na preparação de ferro galvanizado, no qual o ferro é recoberto por uma camada de zinco, que o protege contra ferrugem. Neste processo a peça de ferro é mergulhada em zinco fundido e em seguida passada em laminador.

Existem ainda outros processos de galvanização, como a eletro galvanização que proporciona uma camada de zinco mais uniforme e de espessura desejada.

A liga mais importante do zinco é o latão (cobre-zinco) de usos variados. Além de muitos outros empregos do zinco podemos mencionar o da fabricação de pilhas elétricas.

Na forma de óxido de zinco é empregado na vulcanização de borracha misturado com enxofre, carvão e outros componentes, que entram como "matéria de enchimento" na confecção de pneumáticos e outros artefatos de borracha.

Com o nome de branco-da-china é empregado como pigmento branco, em pintura. É empregado na manufatura de oleados (linoleína).

O óxido de zinco é também usado como adesivo que em mistura com outros ingredientes, constitui um ótimo adesivo empregado na confecção de esparadrapos.

O sulfeto de zinco, artificialmente preparado em mistura com mínimas porcentagens de certas e convenientes impurezas, torna-se fluorescente. Devido a esta propriedade encontra aplicação na fabricação de "écrans" fluorescentes.

O cloreto de zinco é preparado pela reação do zinco com ácido clorídrico. É usado para remover camadas de óxidos e evitar oxidação de superfícies metálicas a serem soldadas. É um dos

ingredientes usados na fabricação de pergaminho vegetal: quando aplicado em solução concentrada decompõe parcialmente as camadas superficiais do papel de celulose, preenchendo os poros deste com outros produtos de decomposição. Torna-se o papel mole e flexível pela lavagem posterior do mesmo e tratamento com solução de glicerina (Saffioti, 1968).

O zinco é um metal-traço útil e essencial em pequenas quantidades ao metabolismo humano, sendo também necessário a outros mamíferos e peixes. Entretanto desconhece-se o seu papel exato no organismo humano, tendo sido associado em funções enzimáticas, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos. A atividade da insulina e diversos compostos enzimáticos depende da sua presença. Slater (1961) assinala que o zinco em concentrações extremamente baixas é importante sob o ponto de vista nutricional pois atua como ativador de enzimas. Tal fato está de acordo com Mishina (1956), que afirma que a molécula da insulina contém zinco e o pâncreas é especialmente rico neste elemento.

A ingestão média diária para crianças é de 0,3 mg/kg e, para adultos, de 0 a 15 mg/kg. Deficiências deste elemento em crianças pode ocasionar atraso no crescimento (EPA, 1976). É grande a diferença entre os níveis essenciais e tóxicos do zinco.

No Canadá foram detectados níveis considerados normais em peixes, de 11 a 48 µg/g, sendo o limite máximo permissível para o consumo humano de 100 µg/g (SEMA, 1977; Ministério da Saúde, 1977; Taylor & De Mayo, 1980).

A presença do zinco é comum em águas naturais, excedendo em um levantamento efetuado nos E. U. A. a 20 mg/l em 95 dos 135 mananciais pesquisados (EPA, 1976).

Os padrões para águas reservadas ao abastecimento público

indica 5.0 mg/l como permissível (SEMA, 1977).

### 1.1.1 FONTES DE LANÇAMENTO DE ZINCO

As fontes de contribuição de metais pesados em geral, e o zinco em particular para o ambiente, são diversificadas. Podem ser feitas referências dentre outras à determinados processamentos industriais, utilização de compostos agrícolas, aplicação na irradiação e controle de moléstias endêmicas, desmonte de rochas nas mineradoras, etc.

O Quadro 1.1 apresenta uma sucinta relação de algumas fontes de lançamento de resíduos contendo apreciáveis quantidades de zinco.

Quanto aos dados quantitativos e suas relações com os organismos aquáticos, um sucinto levantamento de dados relevantes bibliográficos sobre o zinco possibilitou a elaboração das Tabelas 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4. Convém lembrar que o limite para este metal em água de abastecimento é de 5.0 mg/l (SEMA, 1980 e EPA, 1976), para a preservação da vida aquática é de 0.05 mg/l (SEMA, 1977) e para peixes é de 50 µg/g (Ministério da Saúde, 1977), para o sedimento, de 90 a 200 µg/g (Bowden, 1976). O limite para ambiente marinho é para a água do mar de 0.010 mg/l para preservação da vida aquática (EPA, 1976), para o sedimento é de 20 µg/g (EPA, 1976) e 100 µg/g (GESAMP, 1976). Para peixes em geral é de 50 µg/g (Ministério da Saúde, 1976) e 100 µg/g (SEMA, 1985).

**QUADRO 1.1 - Fontes de lançamento de resíduos contendo apreciáveis quantidades de zinco.**

**I - Industrial**

- ligas de latão e bronze
- banhos de Zn e Cu (anticorrosão)
- manufaturas de utensílios de Ag e aço inoxidável
- produção de fibras e fios de rayon, viscose
- produção de papel - jornal
- produção de polpa de madeira
- galvanoplastia
- siderúrgicas
- refinaria de petróleo

**II - Agrícola**

- agrotóxicos à base de Zn:  
Fungicidas ditiocarbâmicos usados no controle de fungos que atacam leguminosas, hortaliças, plantas ornamentais, frutos e madeira.  
Ex. MANCOZEB, PROPINEB, ZINEB, ZIRAM, MANEB.
- algicidas

**III - Doméstica**

- canalizações galvanizadas
- utensílios, colas, cosméticos
- produtos farmacêuticos - unguentos
- porcelanas, tintas e óleos, antissépticos

modificado: (Gianotti, 1985; Saffioti, 1968; Rocha, 1982; Souza, 1984).

TABELA 1.1 - Zinco na água em peixes (nas 1975-1983) e na musculatura (1975) - Nova Serrinha, Camboinhas (nas 1975-1983) e Foz de Iguaçu (1983)

(x) Dados médios

Local de Proveniência dos Peixes	Coleta	Zinco (mg/l)	Local de Coleta	Espécie de Peixe	Zinco (µg/g)
Captação SABIAP (C)	1975	0,0100	C	<i>Morone chrysops</i> (Tilápia)	3,8-8,6
	1976	0,0100	B		1,25
	1977	0,0150	C		=
	1978	0,0100	B		10,3-20,4
	1979	0,0100	C		=
	1980	0,0100	B		=
	1981	0,0100	C		=
	1982	0,0100	B		1,54
	1983	0,0100	C		15,7-19,9
	Balsa Riacho Grande (B)	1975	0,0100	C	<i>Geophagus</i> (Carpa)
1976		0,0100	B		=
1977		0,0150	C		=
1978		0,0080	B		=
1979		0,0100	C		27,03
1980		0,0100	B		=
1981		0,0100	C		=
1982		0,0070	B		=
1983		0,0100	C		10,2
1983		0,0100	B		10,2

Limite permitido (L):  
 a) água de abastecimento: 5,0 mg/l (EPA, 1976), 5,0 mg/l (SEMA, 1976)  
 b) preservação da qualidade: 0,05 mg/l (SEMA, 1976)

Limite permitido (L):  
 a) água de abastecimento: 5,0 mg/l (EPA, 1976), 5,0 mg/l (SEMA, 1976)  
 b) preservação da qualidade: 0,05 mg/l (SEMA, 1976)

**TABELA 1.2 - Concentração de zinco na água, sedimento e peixes em diferentes localidades do Brasil**

Local	CONCENTRAÇÃO DE ZINCO			
	água (mg/l)	sedimento (ug/g)	Peixes (ug/g)	Referências
Cubatão Rio Perdido S.P.	29	557 Altamente poluído		CETESB, 1984
Cubatão Rio Piaçaguera S.P.	0,54	95,8 Moderadamente poluído		CETESB, 1984
Porto Alegre Rio Guaiíba R.S.	< 5,0	< 90	Muscu- Uisce- Tatura - ras 84,9% - 90 % Traíra 103,2 Sardinha 142	D.M.A.E., 1984
Represa Barra Bonita S.P.	< 5,0 0,08-0,20	68,1	40% Uiscenas >100 ug/g Traíra(282) Carpa (185) Piranambeta(252)	CETESB, 1984
Limite Permissível	5,0 mg /l H <sub>2</sub> O (1) Abastecimento: 0,05 mg/l Preservação da Vida Aquática (1)	conc. < 90 N.P. 90 < conc. < 200 M.P. conc. > 200 A.P. (3)	100 ug/g (3) 50 ug/g (4)	SEMA (IBAMA), 1980 (1) (5) EPA, 1976 (1) TAYLOR & COL, 1980 (5) BONDEN, 1976 (3) MIN. SAÚDE, 1977 (4) SEMA (IBAMA), 1977 (2)



**TABELA 1.4 - Teores de zinco em água, sedimento e folhas das plantas de mangue da Baixada Santis (CETESB, 1983)**

Estação	Água (ng/l)	Sedimento (ug/gr)	Folhas (ug/g)		
			Rh	Lg	Fv
Pedro Taquari	19,9	22,7	9,45	23,8	32,3
Imigrantes	< 5,0	20,9	5,97	25,0	39,2
Bairro Alemoa	11,6	14,5	10,9	25,4	46,4
Rio Diana	< 5,0	20,4	16,2	17,9	31,3
Limite Recomendado para H <sub>2</sub> O do Mar	100 ug/l (1)	20 ug/g (2)	NÃO HÁ LIMITE RECOMENDADO		

Rh: Rhizophora mangle

Lg: Laguncularia racemosa

Fv: Avicennia schaueriana

(1) EPA, 1972

(2) GESAMP, 1974

### 1.1.2 CONCENTRAÇÃO E EFEITOS SOBRE OS VEGETAIS

Alguns metais (Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Mo, Se, Cr, Ni, Sn, Si e V) têm importância relevante nos organismos vegetais e animais sendo que a carência deles produz deficiência orgânica ao passo que o excesso resulta em efeitos tóxicos inibidores e até letais.

Quanto aos efeitos dos compostos de zinco sobre os vegetais, pode-se destacar que como elemento traço essencial, a sua deficiência provoca uma série de alterações. Dentre outras, retarda o crescimento e provoca o crescimento anormal das folhas, diminuição da produção de frutos e diminuição das atividades enzimáticas.

Estudos realizados por Salisbury e col. (1969) com relação à deficiência do zinco mostraram que "folha pequena" e "roseta" são sintomas clássicos da escassez desse metal em árvores frutíferas: ambos os sintomas resultam da impossibilidade dos tecidos crescerem normalmente. A falta de expansão das folhas faz com que elas se tornem pequenas: a falta de alongamento dos internos faz com que as folhas localizadas em nós sucessivos se disponham cada vez mais próximos dando o quadro da "roseta". Em algumas espécies, as folhas se tornam cloróticas (degradação da clorofila) enquanto em outras podem ser verde escuro ou azul averdeado. As folhas podem se tornar tortas e necróticas. O florescimento e a frutificação podem ser muito reduzidos em condições de deficiência severa de zinco e a planta inteira pode se tornar anã e deformada. Algicidas e fungicidas à base de zinco inibem o crescimento de certas algas, diminuem a taxa fotossintética, produzem um decréscimo da quantidade e diversidade de algumas espécies e além do mais acumulam tal elemento ao longo da cadeia alimentar. Clendenning e

col. (1960) estudando a ação de fungicidas a base de zinco em algas do gênero MICROCYSTIS, verificaram que o produto inibiu o crescimento delas numa concentração de 0,004 mg/l. Por outro lado, ditiocarbonato de zinco em concentrações de 0,25 mg/l controlou todas as diatomáceas, 43 % de algas verdes azuladas e 16 % de algas verdes.

Os mesmos autores testaram os efeitos do sulfato de zinco em Microcystis pyrifera e em quatro dias de exposição com 1,31 mg/l de  $Zn^{2+}$ , observaram uma diminuição da taxa fotossintética, entretanto uma concentração de 10 mg/l causou uma inativação de 50% das algas.

Austin e col. (1965) estudaram populações de espécies diferentes de fitoplâncton em lagos, que durante 14 anos receberam resíduos de mineração contendo vários metais, entre eles o zinco, e constataram que houve um decréscimo na quantidade e na diversidade de algumas espécies.

Bredosian (1962) estudou os efeitos causados pelo zinco associados ao pH, taxa de área exposta em relação ao peso e a número de pigmentos fotossintéticos em algas.

Bryan e col. (1973 a) mostraram que concentrações de zinco em algas da espécie Fucus vesiculosus e L. digitata são mais altas nas partes mais velhas do vegetal.

Os mesmos autores estudaram a variação da concentração de metais traços em relação a variação sazonal e mostraram que a concentração da maioria dos metais alcançava seu ponto máximo no inverno.

Bryan (1969) constatou que na concentração de 20  $\mu g/l$  de Cd, Cu ou Mn em L. digitata, a taxa de absorção do  $^{65}Zn$  diminuía; foi sugerido que esses metais competiam entre si.

Canterford e col. (1978) estudando a acumulação de vários

metais, entre eles o zinco, em algas diatomáceas marinhas, mostraram que a quantidade de zinco absorvida pelo organismo geralmente aumenta com o aumento da concentração do metal no meio.

O mesmo autor mostra que em ambiente marinho esse metal é encontrado na água na concentração de 0,01 mg/l entretanto espécies de vegetais de águas salinas podem conter quantidades acima de 150 mg/l de zinco.

Existem algumas espécies vegetais tão regularmente associadas com os minérios de zinco que costumam ser tomadas como indicio positivo quando da prospecção mineral. É o caso da gramínea Eriachne mucronata, na Austrália, e de uma variedade de flor silvestre Viola lutwa, na Europa, tolerante a altas concentrações de zinco (Edington e Edington, 1977).

Por outro lado, Chapman (1966) observou em estudos realizados em plantas superiores que concentrações entre 3 a 10 mg/l de zinco provocaram sintomas tóxicos em algumas espécies.

Huges (1985) em estudos realizados com árvores frutíferas utilizando <sup>65</sup>Zn como elemento traçador, mostrou que a absorção do fertilizante pulverizado, era mais eficaz pelas folhas do que pelo solo e resultando na estação seguinte, em aumento da produção de frutas.

### 1.1.3 CONCENTRAÇÃO E EFEITOS SOBRE OS ANIMAIS

Vários autores têm realizado experiências para verificar as reações de animais diante de um composto químico e constataram que os efeitos tóxicos variam consideravelmente entre as espécies.

Quanto aos peixes alguns estudos realizados por Malagrino e

col.(1986), Malagrino e Rocha (1987), Malagrino e col.(1986a) e Malagrino e col.(1986b), mostraram que estes podem ter três tipos de atitude em relação ao composto químico testado:

- Percebem o poluente e reagem,
- Não percebem o poluente,
- Percebem mas entram em estado de torpor.

Sabe-se que os metais pesados, de uma forma geral, são tóxicos aos peixes e por esse motivo têm recebido muita atenção recentemente por profissionais da área de saúde ambiental.

Entretanto a literatura é tanto confusa, quanto contraditória.

Estudos realizados por Skidmore (1964) não revelaram nenhuma relação entre os níveis de metais nos tecidos, comportamento, peso ou idade de diferentes espécies de peixes examinados.

Hughes e col. (1983) verificaram correlações tanto positivas quanto negativas entre as concentrações de metais nos tecidos, parâmetros de crescimento, bem como comportamento.

Inúmeros pesquisadores tentaram correlacionar alguns fatores físico-químicos com a absorção de metais pesados em peixes e entre esses fatores incluíram o alimento e os níveis de metais na água.

Entretanto poucos desses pesquisadores constataram que a concentração desses metais em peixes não é dependente de apenas um fator, mas resulta de uma interação complexa de muitos fatores.

O zinco é reconhecido como elemento essencial para microrganismos aproximadamente há 100 anos e nos ratos por volta de 50 anos, mas sua deficiência foi inicialmente demonstrada no homem há 25 anos. Tal deficiência foi associada a severa anemia por carência de ferro.

Os efeitos tóxicos do zinco sobre os peixes são muito

conhecidos. A ação desse íon metálico pesado sobre o sistema respiratório dos peixes provoca a precipitação da secreção da mucosa produzida pelas brânquias. Assim o espaço interlamelar é obstruído, e o movimento normal dos filamentos das brânquias é bloqueado.

Skidmore e col. (1972) estudando os efeitos tóxicos do sulfato de zinco sobre a estrutura das brânquias em trutas, comprovam tal fato.

Lloyd (1960) em estudos realizados com trutas considerou que a dureza é o fator mais importante para a toxicidade do zinco; água com 12 mg/l de  $\text{CaCO}_3$  e uma determinada concentração de zinco é 10 vezes mais tóxica do que em uma concentração de 320 mg/l de  $\text{CaCO}_3$ .

Saliba e Krzyz (1976) estudando a ação tóxica do zinco, encontraram um decréscimo na quantidade de ovos de Artemia salina em relação à concentração do sulfato de zinco.

Brown e col. (1971) determinaram a toxicidade de certos metais, entre eles o zinco, em Artemia salina e Ophryotrocha labronica e os efeitos nefastos sobre o crescimento e a mortalidade.

Stephen e col. (1969) determinaram a toxicidade aguda de vários sais metálicos, dentre eles o zinco, em 3 espécies diferentes de insetos aquáticos (importante fonte de alimento para peixes), mostrando que dependendo de condições ambientais eles acusam letalidade.

Eldon e col. (1980) determinaram os efeitos de baixas concentrações de diversos metais pesados, entre eles o zinco em Macoma balthica (molusco marinho) sobre o comportamento de escavação e possível recuperação em exposição de curta duração.

Hughes e col. (1985) mostraram respostas adversas em trutas

nos sistemas cardio-respiratórios e osmoregulação, quando expostas durante 7 dias ao elemento zinco.

Crandall e col. (1962) estudando os efeitos subletais de diversos elementos tóxicos, entre eles o zinco, sobre o crescimento do "guppy" Lebistes reticulatus (Poecilia reticulata), encontraram efeitos nefastos sobre a maturidade sexual, crescimento e letalidade.

Billard e col. (1985) em estudos realizados com gametas e fertilização em trutas (Salmo gairdneri) utilizando vários metais, entre eles o zinco, mostraram que os estágios iniciais são mais sensíveis que os gametas.

Skidmore (1984) revisando certos trabalhos mostrou que certos fatores ambientais têm influência sobre a toxicidade dos compostos de zinco em peixes e outros organismos aquáticos.

Benoit e Halcombe (1978), em estudos realizados com Pimephales promelas em presença de compostos de zinco determinaram que tal elemento afeta a fixação, fragilidade dos ovos, bem como sua quantidade. Em estudos realizados pelos mesmos autores com a mesma espécie de peixe, foi observado no ciclo de vida completo com testes sub-letais, que são afetadas a reprodução, o crescimento e a própria sobrevivência.

Branco (1960) concluiu que a letalidade é acelerada quando é promovida a agitação da água. Foi verificado que a agitação da água provocava a asfixia de peixes "guarús", devido à coagulação do muco sobre as brânquias.

Gianotti (1985) concluiu em seu estudo que na espécie Poecilia reticulata os machos foram mais vulneráveis à ação do zinco do que as fêmeas e que a toxicidade do metal aumentou com a diminuição dos níveis da alcalinidade e dureza da água.

Burton e col. (1975) submetendo Lepomis macrochirus a concentrações letais e subletais de zinco, verificaram que estes peixes morreram 26 vezes mais rápido a 30°C do que a 20°C.

Concentrações tóxicas de compostos de zinco causam mudanças adversas na morfologia e fisiologia do peixe. Concentrações agudamente tóxicas induzem ao colapso celular das brânquias e a sua obstrução com muco. Concentrações cronicamente tóxicas por outro lado, causam enfraquecimento geral e alterações histológicas amplas em muitos órgãos. O crescimento e a maturação são retardados (EPA, 1976).

A concentração deste íon metálico é maior nos organismos bentônicos que em peixes, e nestes é maior que nas espécies carnívoras.

Concentrações da ordem de 0,4 µg/l de zinco são registradas em algumas áreas estuarinas causando mortandade de larvas bivalves (EPA, 1976).

Muitos são os dados disponíveis sobre os efeitos do zinco no ambiente marinho. Este metal é acumulado por algumas espécies. Os animais, por exemplo, contêm zinco em quantidades que vão de 0 a 1500 mg/kg (EPA, 1976).

Existe uma quantidade apreciável de zinco nos tecidos dos peixes, sendo que, de acordo com Vinogradov (1953) há mais zinco que cobre e muito mais ainda que ferro.

Cohen (1965) definiu a bioacumulação como a transferência de uma determinada substância que se encontra no ambiente para um organismo, e deste para outros através da cadeia trófica, podendo chegar a níveis bastante elevados.

Evidencia-se por estudos realizados pela CETESB que a área da Baía de Santos e estuários de Santos e São Vicente encontram-se

contaminados por esse metal (CETESB, 1984).

Neste estudo todas as espécies analisadas apresentam teores de zinco mais elevados nas vísceras em relação à musculatura. Os teores mais elevados ocorreram em bagres, que são espécies omnívoras, de hábitos demersais, vivendo em contato direto com o fundo.

O hábito alimentar dos peixes parece influir diretamente sobre os teores de zinco encontrados nas musculaturas e nas vísceras.

De todos os metais analisados nesta campanha (CETESB, 1984), muita atenção deve ser dada ao zinco, mercúrio e cobre, que foram aqueles que apresentaram fatores de concentração significativos nos peixes.

Fatores de concentração significativos de zinco são observados apenas nas vísceras das espécies de peixes que, de uma maneira geral, vivem em fundos lodosos e se alimentam dos organismos do mesmo, como bagres, tainhas, paratis, linguados, etc. (Boldrini e Pereira, 1987).

Por outro lado, deve-se levar em consideração o efeito sinérgico do zinco em presença do alumínio e cádmio e outros metais pesados. (Boldrini e Pereira, 1987).

Desde 1983, a CETESB vem desenvolvendo um programa específico, abrangendo todo o sistema alto e médio Tieté, incluindo-se aí o estudo da Represa Barra Bonita. Análises efetuadas em musculatura e vísceras de peixe dessa represa revelaram que nas 2 campanhas efetuadas em 1984, os teores de zinco em vísceras de peixes comerciais apresentam valores acima do limite estabelecido pelo Ministério da Saúde e Secretaria Especial do Meio Ambiente.

Alliabadi e Sharp (1985), em estudos de transferência de metais pesados de bactérias para protozoários, numa relação

predador-presa, verificaram que a acumulação do zinco pelo protozoário foi muito maior que os demais metais.

Spehar e col. (1978) investigaram os efeitos sinérgicos de uma mistura de cádmio e zinco sobre o peixe (Jordania floridae) em todos os estágios de desenvolvimento e efeitos desses metais no comportamento.

Cross e col. (1973) comparam a relação entre o peso total do corpo e a bioacumulação do mercúrio e outros metais, entre eles o zinco, na musculatura branca de peixes que habitam diferentes ambientes no Atlântico.

Simpson (1978) em estudos de laboratório e campo compara a absorção e eliminação de zinco por medulhões e estabelece uma relação entre o peso do corpo e o ciclo reprodutivo.

No homem esse metal traço é essencial em pequenas quantidades ao metabolismo. Seu papel está implicado em funções enzimáticas, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos.

A deficiência do zinco em certos animais é manifestada por anomalias de pele e causadora de uma doença que degenera a queratina. Por outro lado o conteúdo de zinco nas glândulas sexuais de porcos machos é alto, provando ser este elemento essencial para o desenvolvimento e função sexual normal nesses mamíferos.

No homem a cirrose pós-alcoólica do fígado parece estar ligada à deficiência do zinco (Krause e Mahan, 1984).

Há cerca de 1,4 a 2,3 g de zinco no corpo do homem adulto. Os órgãos que possuem a maior concentração são: fígado, pâncreas, rins, ossos e músculo voluntário. Outros tecidos com altas concentrações são as várias partes do olho, próstata, espermatozóide, pele, cabelos e unhas.

Muitas questões, tendo em vista o papel biológico do zinco no

homem são ainda uma incógnita; entretanto está claro que esse elemento participa de muitas atividades metabólicas. Há cerca de 70 ou mais metaloenzimas onde é exigida a presença do zinco.

A absorção do zinco é afetada pelo tamanho do corpo, níveis de zinco na dieta e a presença de substâncias interferentes.

O zinco pode ser obtido de uma dieta balanceada contendo suficiente proteína animal. Carnes, fígado, ovos, frutos do mar (principalmente ostras) são excelentes fontes de zinco.

O conteúdo de zinco da maior parte da água potável é desprezível. O leite materno contém cerca de 20 mg/l de zinco.

A deficiência do zinco provocou anomalias congênitas em crianças nascidas de mães alcoólatras (Krause e Mahan, 1984).

Por outro lado, crianças com dieta pobre de carnes tiveram perda do olfato e do paladar, além da perda de cabelos, entretanto bastou que o zinco estivesse presente para reverter totalmente o quadro (Krause e Mahan, 1984).

Casos de envenenamento podem ocorrer, seja por ingestão de alimentos, por bebidas contaminadas, de poeiras e fumaça com altos teores de zinco ou contato da pele com o zinco e seus sais (Rocha e col., 1985).

Por outro lado o envenenamento por zinco através da ingestão de peixes ou moluscos altamente contaminados é difícil de ocorrer, pois os mesmos devido à coloração azul-esverdeada produzida, são rejeitados para consumo. Entretanto há risco potencial e as doses excessivas desse metal podem causar problemas pulmonares, febre, calafrios, gastroenterites, sonolência, náuseas, desidratação e descoordenação muscular (Rocha, 1982).

## 1.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM TRACADORES RADIOATIVOS

Em termos ecotoxicológicos, para saber se uma substância tem efeito sobre o ambiente aquático necessita-se saber como é seu estado, sua estrutura e dinâmica em condições normais.

A qualidade das águas continentais é com frequência afetada pela introdução de substâncias tóxicas variadas, entre elas citam-se os metais pesados. Esses elementos altamente tóxicos podem causar a destruição parcial ou mesmo total da fauna e da flora. São bem conhecidos os efeitos tóxicos causados sobre os peixes pelos compostos de metais pesados e são vários os fatores que devem ser levados em conta com relação à intoxicação de organismos aquáticos em geral, por esses elementos.

A detecção da presença desses elementos conta com recursos altamente eficientes obtendo-se excelentes resultados.

Por outro lado, a determinação exata de concentrações de determinadas substâncias não dispensa provas de sensibilidade dos seres vivos a elas expostos, para efeitos práticos e providências adequadas.

Os procedimentos associados se completam e, através deles, chega-se ao ideal de se estabelecer doses mínimas letais, ingestão diária aceitável e vários outros parâmetros de grande valia.

Os ensaios biológicos em geral tornaram-se instrumentos básicos para o estudo da poluição das águas nos últimos 30 anos (Standard Methods, 1976).

Os primeiros estudos empreendidos para a verificação dos efeitos de surfactantes (componentes de produtos de limpeza) sobre peixes foram iniciados ao final da década de 1950 na Inglaterra, Alemanha, Bélgica e União Soviética (Marchetti, 1965).

Certos países como a França, Polónia, Estados Unidos, Canadá e União Soviética desenvolveram técnicas utilizando testes de bioensaios a fim de determinar a toxicidade relativa de efluentes domiciliares e indústrias antes de serem lançados em corpos d'água (ABEL, 1974).

A técnica dos ensaios biológicos com a finalidade de avaliar a qualidade da água fundamenta-se na utilização de organismos vivos que funcionam como indicadores da presença de substâncias tóxicas, que se manifestam por diversas reações ou respostas biológicas.

Os peixes são sem dúvida nenhuma os organismos mais frequentemente utilizados em ensaios biológicos devido ao fato de os sintomas de intoxicação serem de fácil observação.

Diversos géneros e espécies têm contribuído para essa finalidade, sendo inúmeros os trabalhos publicados sobre o assunto. Além dos peixes, são utilizados crustáceos, moluscos, insetos adultos e larvas, briozoários, equinodermas, vermes, etc (EPA, 1972; EPA, 1976).

À vista dessas considerações e face à literatura sobre o assunto, fica clara a preocupação das instituições sanitárias brasileiras quanto à necessidade de desenvolver ensaios biológicos para avaliação da qualidade das águas e o controle da poluição.

No Brasil entretanto os ensaios biológicos com o objetivo de avaliar a qualidade das águas têm história recente. A CETESB iniciou-os por volta de 1977 (Pereira e col., 1978) a Escola de Engenharia da USP, em São Carlos, em 1978 (Lima, 1985); a Faculdade de Saúde Pública da USP em 1980 (Branco, 1980; Rocha e col., 1986; Pereira e col., 1986; Malagrino e col., 1985); o Instituto Oceanográfico da USP em 1977 (Tommasi e col., 1981; Pereira e col., 1981; Malagrino e col., 1981).

Com traçadores radioativos os ensaios biológicos permitem fornecer informações em pesquisa ecológica, sempre que for necessário de se obter dados adicionais. O uso da técnica de traçadores radioativos vêm aumentando nossos conhecimentos das águas continentais e oceânicas e dos seres vivos que habitam esses ecossistemas.

Na tabela 1.5 são apresentados os resultados obtidos por pesquisadores que utilizaram a técnica dos traçadores radioativos bem como de estudos de acumulação e eliminação de radionuclídeos provenientes de centros de pesquisas, centrais nucleares, assim como do "fall out".

**TABELA 1.5 - Resultados obtidos por pesquisadores que utilizaram a técnica de traçadores radioativos e estudaram a absorção e eliminação de radionuclídeos provenientes de centros de pesquisa, centrais nucleares e "fall out".**

Tracador utilizado	Espécie testada	Finalidade de estudo	Referências
$^{134}\text{Cs}$	35 espécies de peixes marinhos, água doce e moluscos	absorção	Morgan, 1964
$^{60}\text{Co}$	Peixes da espécie ICTALURUS MELAS	absorção e eliminação em diversos órgãos	Reed, 1971
$^{85}\text{Sr}$	Peixes da espécie CARASSIUS AURATUS	trocas do Ca e Sr	Berg, 1972
$^{60}\text{Co}$ e $^{134}\text{Cs}$	Moluscos comestíveis	acumulação e eliminação	Harrison, 1973
$^{45}\text{Ca}$	Peixes da espécie PUCCILIA RETICULATA	absorção e incorporação em tecidos diferentes	Rosenthal, 1956
$^{203}\text{Hg}$	Peixes da espécie CARASSIUS AURATUS	distribuição e retenção em vários tecidos	Weisbart, 1973
$^{90}\text{Tc}$	Molusco HALIOTIS RUFESCENS	absorção, eliminação, distribuição nos tecidos	Spies, 1975
$^{134}\text{Cs}$	Espécies de peixes marinhos comerciais	distribuição em vários órgãos e tecidos	Jefferies e col., 1971
$^{134}\text{Cs}$	Moluscos ESCHISTOSSOMA MANSONI	incorporação, eliminação, reprodução e sobrevida	Kikuchi e col., 1968
$^{57}\text{Co}$ , $^{58}\text{Co}$ e $^{60}\text{Co}$	Várias espécies de moluscos comestíveis	acumulação e eliminação	Shimizu, 1975
$^{109}\text{Cd}$	Peixes comestíveis, trutas	retenção e eliminação	Jaakkola, 1972
$^{203}\text{Hg}$	Peixes da espécie PUCCILIA RETICULATA	absorção e retenção	Kudo, 1975
Benzeno $^{14}\text{C}$	Ovos, larvas e alimento de larvas de arenque	absorção	Eldridge e col., 1978
$^{14}\text{Sb}$	Mexilhões, camarões e caranguejos	absorção	Van Weers e col., 1976
$^{60}\text{Co}$	Camarões	absorção e retenção	Van Weers, 1975
$^{65}\text{Zn}$	Mexilhões comestíveis	absorção	Dahlgard, 1975
$^{65}\text{Zn}$ , $^{54}\text{Mn}$ , $^{54}\text{Fe}$ e $^{60}\text{Co}$	Moluscos comestíveis	acumulação	Pentthreath, 1973

### 1.2.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS UTILIZANDO O $^{65}\text{Zn}$

O uso do  $^{65}\text{Zn}$  como ferramenta ecológica para estudar o comportamento do zinco na flora e fauna de um ecossistema tem sido o objetivo de diversos trabalhos. Um traçador radioativo é um elemento químico que contém alguns átomos radioativos. Quimicamente não se distingue do material não radioativo, mas pode ser facilmente seguido em sua passagem através do corpo.

Dados sobre a absorção de  $^{65}\text{Zn}$  referem-se principalmente às algas, plantas superiores, moluscos, crustáceos, insetos e suas larvas. Por outro lado, dados sobre a absorção do  $^{65}\text{Zn}$  por peixes, especialmente os de água doce no Brasil, são muito escassos.

Alguns estudos têm sido realizados com  $^{65}\text{Zn}$  como traçador em experimentos de absorção e eliminação em plantas aquáticas e algas.

Knauss e col. (1954) descobriram que a quantidade de  $^{65}\text{Zn}$  absorvida por culturas de CHLORELLA variava de acordo com a concentração de zinco no meio.

Rice (1956) relatou uma absorção rápida e quase completa de  $^{65}\text{Zn}$  por culturas de NITZCHIA tanto em presença de luz quanto na ausência.

Bachmann e col. (1960) usando 6 espécies de algas marinhas bênticas, encontraram uma relação direta entre fotossíntese e absorção de  $^{65}\text{Zn}$  em presença de luz, sem que tivesse ocorrido uma absorção apreciável na ausência de luz.

Gutknecht (1961) investigou os efeitos do metabolismo, pH, íons e de temperatura na absorção e acumulação de  $^{65}\text{Zn}$  por Uva lactuca, em presença da luz e ausência.

Gutknecht (1965) relaciona vários fatores ambientais na absorção e eliminação do  $^{65}\text{Zn}$  em quatro espécies de algas bênticas

marinhas.

Chipmann (1958) encontrou grandes concentrações de  $^{65}\text{Zn}$  em diatomáceas marinhas, verificando que a eliminação desse elemento é muito lenta.

Mishina e col. (1965) relacionaram o tamanho do corpo, temperatura do ar com taxa metabólica e de eliminação do  $^{65}\text{Zn}$  em caracóis do pântano salgado, em experimentos de campo e laboratório.

Baudin (1973) determinou por meio de estudos experimentais a fixação e a eliminação do  $^{65}\text{Zn}$  em moluscos comestíveis.

Chipmann e col. (1958) utilizando moluscos comestíveis tais como: ostras, mariscos e mexilhões, verificou que a quantidade de  $^{65}\text{Zn}$  absorvido era maior em ostras seguida por mariscos e mexilhões.

Young (1967) descreve experimentos envolvendo respostas comportamentais do molusco comestível Mytilus californianus, mantido em condições naturais seguindo as trocas do  $^{65}\text{Zn}$  em diferentes ambientes.

Berg e Weiss (1975) desenvolveram em laboratório um estudo de transferência do  $^{65}\text{Zn}$  dos sedimentos para larvas de CHIRONOMÍDEO (larva de inseto, importante alimento para peixes) e destes para peixe de água doce, levando em conta o efeito do cádmio nesta transferência.

Odum (1961) realizando estudos no campo e em laboratório com artropoda (insetos e crustáceos), constatou que a taxa de excreção de quantidades apreciáveis do traçador  $^{65}\text{Zn}$  é proporcional a certa taxa na atividade, especialmente, taxas de consumo de alimento e produção de ovos.

Baudin (1981) estudou em laboratório as trocas do  $^{65}\text{Zn}$  como

traçador entre a água e o sedimento, e a fixação desse elemento por uma espécie bentônica Nereis diversicolor, que é um anelídeo poliqueta que faz parte de cadeia alimentar piscícola.

Gutknecht (1965) mostrou que a eliminação do  $^{65}\text{Zn}$  em Fucus vesiculosus é extremamente lento.

Bodansky (1920), Hiltner e col. (1919) e Okada (1939) registraram no início do século que as ostras acumulam altas concentrações de zinco, atribuindo-se ao fenômeno a denominação de "esverdeado da ostra".

Lowman e col. (1957) e Lowman (1960) detectaram a presença de  $^{65}\text{Zn}$  em pássaros marinhos, atum e no plâncton, após a ocorrência de testes nucleares no Pacífico.

Townsley e cols. (1961) estudaram os níveis de  $^{65}\text{Zn}$  que foi acumulado e transferido numa cadeia alimentar onde utilizou-se micro alga-zooplâncton e peixes.

Shulman e cols. (1961) estudaram os efeitos da temperatura, salinidade e absorção do alimento sobre a excreção do  $^{65}\text{Zn}$  em peixes marinhos pequenos.

Matthiessen e Brafield (1977) relacionaram o peso do corpo com a absorção do  $^{65}\text{Zn}$  em peixes da espécie Gasterosteus aculeatus.

Em experimentos posteriores os mesmos autores observaram que a absorção do  $^{65}\text{Zn}$  em água dura foi 3,5 vezes maior do que em água isenta de cálcio, apesar da água dura ser menos tóxica. Esses autores verificam que a concentração de  $^{65}\text{Zn}$  foi maior nas brânquias e que esta espécie reduz seus níveis de zinco (75 %) quando expostos a água isenta de zinco.

Pentreath (1976) estudou a acumulação e retenção do  $^{65}\text{Zn}$  em ovos e larvas, a relação desse metal entre os tecidos e o tempo, bem como a meia-vida biológica a partir do alimento marcado com o

peixe P. platessa.

Baudin (1987) estudou a retenção de  $^{65}\text{Zn}$  absorvido por via trófica em carpas Cyprinus carpio.

Myttenaere e cols. (1975) estudaram a influência do cádmio estável na transferência do  $^{65}\text{Zn}$  no peixe Carassius auratus.

Slater (1981) fez uma análise da acumulação comparativa do  $^{65}\text{Zn}$  em alevinos de várias espécies de trutas. Paralelamente fez um estudo da distribuição deste elemento em vários órgãos.

Nakatani (1986) em experimentos realizados em laboratório mostrou a distribuição e retenção do  $^{65}\text{Zn}$  em trutas após ingestão oral, efeitos crônicos da ingestão do  $^{65}\text{Zn}$  no corpo, sobre a capacidade de natação nesta espécie.

Hodson (1975) determinou a absorção do  $^{65}\text{Zn}$  em salmão do Atlântico em concentrações letais em temperaturas que variaram de 3, 11 e 19°C.

Lebedeva e Kuznetsova (1969) em experimentos realizados em laboratório com carpas jovens, estudaram a distribuição, taxa de armazenamento e eliminação do  $^{65}\text{Zn}$  em vários órgãos. Paralelamente verificaram o efeito do cálcio estável na absorção do  $^{65}\text{Zn}$ .

Hoss (1964) estudou a acumulação do  $^{65}\text{Zn}$  pelo peixe "Flounder": do género Paralichtys.

Edwards (1987) utilizando  $^{65}\text{Zn}$  como elemento traçador estimou a taxa respiratória, bem como a taxa de eliminação no peixe Pleuronectes platessa em diferentes níveis alimentares.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar de um variado número de trabalhos, constatando os

efeitos tóxicos de metais pesados sobre a vida aquática, pouca atenção tem sido dada às possibilidades da utilização de traçadores radioativos no estudo da bioacumulação desses elementos químicos na cadeia alimentar, envolvendo especialmente a fauna íctica, pelo menos no Brasil.

Ainda que existam trabalhos enfocando as espécies de regiões temperadas, no Brasil são escassas as pesquisas nesse campo, e portanto, a metodologia principalmente a nível de praticidade de utilização em programas de controle ambiental está por ser estudada. Nas áreas de atuação do saneamento e na agricultura existem alguns trabalhos com a aplicação de traçadores radioativos (Garcia, 1977; CETESB, 1978; Ferreira e cols., 1982), mas especificamente quanto à bioacumulação em peixes em território nacional, é preciso enfatizar que a bibliografia é inexistente. Portanto é importante estudar a bioacumulação de zinco em peixes através de ensaios biológicos com traçadores radioativos, utilizando-se o  $^{65}\text{Zn}$ , cuja presença nas águas pode trazer graves inconvenientes à fauna íctica.

Corroboram esta assertiva, os trabalhos de Gianotti, 1983; Rocha, 1982; Rocha, 1985; Pereira, 1984; Souza, 1987; CETESB, 1980; Tommasi, 1976 e outros que mostram ter havido um aumento das concentrações de zinco nas águas de lagos, represas, rios, estuários e baías em até 60 mg/l.

Embora o zinco possa ser removido em processos convencionais de tratamento de água ele pode persistir nos corpos hídricos durante até 30 anos.

Deve também ser ressaltado que os traçadores radioativos foram introduzidos nos estudos de controle da poluição do meio ambiente em decorrência do grande sucesso obtido nas aplicações desses

traçadores; essa técnica, desenvolvida a partir de 1958, em escala mundial, é bem conhecida nos países desenvolvidos e muito pouco entre nós.

Assim o uso da técnica do  $^{65}\text{Zn}$  como elemento traçador em bioensaios, objeto desta dissertação, constitui pelo menos a nível de território brasileiro, pesquisa pioneira.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ressaltar a importância dos traçadores radioativos no estudo de bioacumulação em peixes.
- Estabelecer e discutir metodologia para uso do  $^{65}\text{Zn}$  no estudo de bioacumulação através de ensaios biológicos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ORGANISMO-TESTE

A escolha da espécie Poecilia reticulata fundamentou-se nas seguintes características:

- a) na relativa facilidade de ser encontrado em todo o território nacional;
- b) no tamanho relativamente pequeno (2 a 4 cm);
- c) no fácil manuseio, captura e transporte;
- d) na sua adaptabilidade às condições de laboratório;
- e) na sua importância na cadeia alimentar;
- f) de acordo com a APHA (1970), trata-se de uma espécie

- "padrão" em estudos de ensaios biológicos e tem sido empregado na área toxicológica em toda parte do mundo;
- g) sua biologia, distribuição e comportamento são fortes fatores que reforçam sua aceitabilidade como espécie teste;
- h) as fêmeas desta espécie são vivíparas, havendo portanto suprimento constante a partir do estoque no laboratório.

Levou-se em conta na realização dos testes, as condições mais comumente encontradas nos corpos d'água do Estado de São Paulo, quanto à dureza, pH, temperatura da água, conforme CETESB (1984).

A APHA (1980) propõe 50 espécies bioindicadoras (entre as quais Poecilia reticulata) para águas continentais.

A OECD (1984) propõe a utilização de Brachydanio rerio e Poecilia reticulata entre outras.

A ISO (1982) recomenda o uso de Brachydanio rerio e Poecilia reticulata.

Sprague (1973) propõe as mesmas espécies, além de incluir outras.

### 3.1.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Apesar de não ser nativa de território brasileiro, a espécie selecionada foi introduzida há muito tempo, sendo encontrada em águas com baixo teor de carbonatos e bicarbonatos. Segundo Rosen e Bailey (1963) esses animais são nativos das Antilhas Holandesas, Barbados, Venezuela e Guiana Inglesa, mas sua distribuição mundial ocorreu pela ação do aquarismo. Podem ser encontrados ainda em

vários habitats tanto em água salobra como doce, entretanto não deve ser encontrados em rios de montanhas, grandes rios e ilhas distantes; habitam principalmente águas rasas (Nomura, 1977).

### 3.1.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS

Os indivíduos desta espécie toleram temperaturas em torno de 15°C por um curto período de tempo, adaptando-se melhor entre 22 e 24°C (Nomura, 1977).

Podem viver em água com pouco oxigênio dissolvido e sendo vivíparos não depositam seus ovos e portanto não necessitam de oxigênio dissolvido para sua eclosão.

O dimorfismo sexual em relação ao tamanho ocorre, pois que nos machos a energia empregada no crescimento é desviada para a natação na procura de fêmeas férteis, enquanto que nas fêmeas a energia é utilizada para o crescimento do corpo e gônadas, produção de ovos e transferência de alimento para desenvolver os embriões.

Por outro lado, os indivíduos desta espécie são onívoros e portanto empregados como larvófagos na eliminação de larvas de algumas espécies de mosquitos transmissores de doenças.

### 3.2 COLETA E MANUTENÇÃO NO LABORATÓRIO

Segundo a APHA (1960) e a ISO (1962) o local escolhido para a obtenção dos organismos aquáticos deve estar livre de qualquer tipo de poluição, desta maneira evita-se que os organismos tenham algum grau de contaminação. Por outro lado, Doudoroff (1951) considera

dois importantes fatores na execução de ensaios biológicos:

- a) os organismos aquáticos devem ser coletados num mesmo curso d'água e;
- b) o curso d'água não deverá estar poluído pela substância em estudo.

Para atender estas exigências, procurou-se um local onde houvesse uma menor ação antrópica.

Após visitar várias localidades próximas da capital (São Paulo) optou-se por um lago no município de Arujá, São Paulo, distante aproximadamente 30 km da zona urbana da cidade de São Paulo. Esse lago situa-se dentro de uma reserva particular onde não há qualquer lançamento de esgoto ou aplicações de defensivos agrícolas.

Os organismos escolhidos para os testes eram sempre coletados por volta de 12 h, quando apresentavam-se com mais fácil percepção. Para sua captura foram utilizadas redes especiais cuja textura não provocasse lesões externas; portanto o máximo de cuidado foi tomado para que sofressem o mínimo de traumatismos, que os torna susceptíveis a doenças (Standard Methods, 1976).

Os peixes assim coletados foram transportados de acordo com as normas estabelecidas internacionalmente, ou seja, sob aeração constante, temperatura da água entre 20 e 25°C, pH neutro ou ligeiramente alcalino (EPA, 1984), (Orsanco, 1974). Imediatamente após serem coletados, os organismos eram colocados em recipientes de plástico ou isopor com água do próprio local e levados para o laboratório da Divisão de Monitoração Ambiental do IPEN-CNEN/SP.

No laboratório os organismos receberam tratamento profilático e quimioterápico contra fungos, bactérias e protozoários, que eventualmente estivessem presentes nos organismos-teste. O

tratamento foi feito com NaCl dissolvido em água, na proporção de 3:1000 e antibiótico de largo espectro. Após tal procedimento teve início o período de aclimação com a transferência dos aquários de tratamento profilático para tanques de cimento-amianto revestidos com tinta epóxi para evitar possíveis contaminações. Tais tanques possuem as seguintes dimensões: 0,40m de comprimento, 0,40m de largura e 0,32m de altura, contendo desse modo uma capacidade total de 50 l (Figura 3.1).

Para evitar uma alta concentração de organismos que poderia gerar estresse nos animais e seria prejudicial à interpretação dos resultados, optou-se por colocar aproximadamente 150 organismos por tanque.

Para maior oxigenação do meio, remoção de restos alimentares e excretas, os tanques receberam filtros biológicos com dispositivos de filtração da água (filtro de lã de vidro), aeração constante com compressores de ar e controle de temperatura por meio de termostatos e respectivo aquecedor.

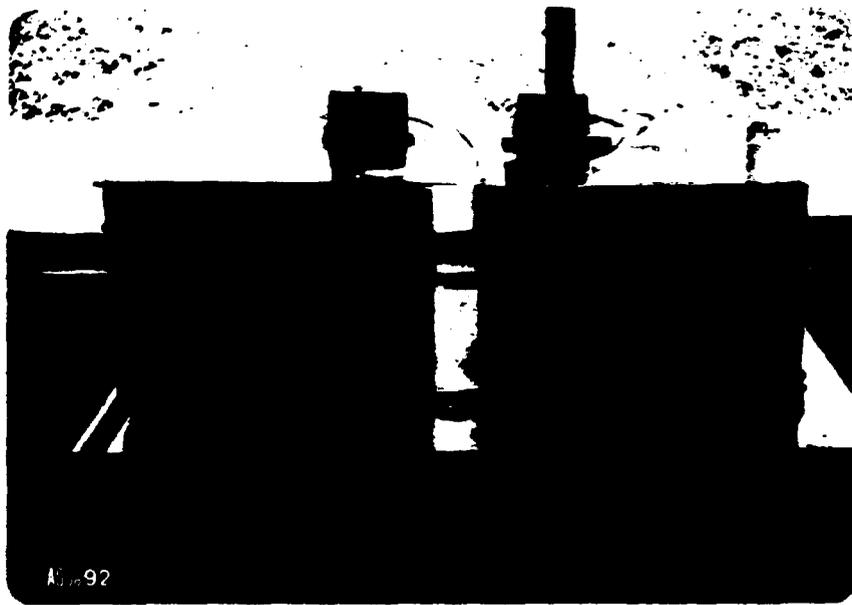


FIGURA 3.1 - Tanque de manutenção com filtro biológico e termostato para aclimação dos organismos.

### 3.2.1 FASE DE ACLIMATAÇÃO DOS ORGANISMOS

Os organismos aquáticos são profundamente ligados às características do meio ambiente em que vivem. Qualquer alteração na composição química da água se reflete sensivelmente na população.

Segundo Sprague (1969) poucos dados existem sobre aclimação de peixes às condições de laboratório, entretanto sugere este autor um período de pelo menos uma semana.

Segundo a ISO (1982), os organismos selecionados de uma população de um mesmo tanque de estocagem, deverão se aclimatar por um mínimo de duas semanas antes do ensaio, sob as mesmas condições de qualidade da água e temperatura, mantidos durante o ensaio.

Os peixes testados deverão estar isentos de doenças e sintomas visíveis de traumatismo.

De acordo com o Standard Methods (1976) os animais coletados no campo deverão ser mantidos em "quarentena" por um mínimo de sete dias para a observação de parasitas e doenças e para a recuperação do estresse provocado pela coleta.

Se mais que 10% dos animais coletados morrerem após o segundo dia ou se tiverem parasitados ou doentes, deverão ser descartados. Caso isso não ocorra, serão transferidos para os tanques de manutenção dos estoques e daí começará a aclimação nas condições dos ensaios. O período de aclimação será governado pelo tipo de organismo, extensão de mudanças na qualidade da água, bem como no tipo de ensaio biológico que se propõe utilizar.

De acordo com as características do ensaio escolhido, optou-se por um período de aclimação de aproximadamente 15 dias.

Tanto durante o transcorrer da aclimação como nos ensaios

foi mantido um fotoperíodo com a época do ano.

### 3.2.2 ETAPA EXPERIMENTAL

#### 3.2.2.1. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ZINCO RADIOATIVO

A solução de zinco radioativo foi preparada dissolvendo-se o zinco em pó irradiado no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do JFEN na posição 34b, onde o fluxo de nêutrons é da ordem de  $10^{13}$  n.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Para isso cerca de 50 mg de zinco em pó foram envolvidos em um invólucro de papel alumínio previamente limpo e depois acondicionado num recipiente de alumínio para irradiação.

O tempo de irradiação necessário foi de cerca de 240 horas com 8 horas de irradiação por dia.

Após um tempo de resfriamento de cerca de 10 dias, o zinco irradiado foi dissolvido pela adição de algumas gotas de ácido sulfúrico 98 % e água.

A mistura foi aquecida em uma chapa elétrica até a dissolução completa do zinco. Após a dissolução a solução foi aquecida até a secura para a eliminação do ácido sulfúrico em excesso. Esta operação foi repetida 3 vezes.

O resíduo obtido, constituído de sulfato de zinco, foi dissolvido com água quente, o pH corrigido até a neutralidade e depois diluiu-se a solução em 25 ml de água destilada em balão volumétrico.

Do balão volumétrico foram retirados 10 ml da solução que foram lançados em aquários com capacidade de 10 litros cada um, de forma a obter uma solução final com concentração da ordem de 2 mg/l.

com atividade da ordem de 3000 cpm, determinada num analisador monocanal acoplado a um cristal de NaI(Tl), tipo poço de 5,1 cm X 4,5 cm, marca HARSHAW.

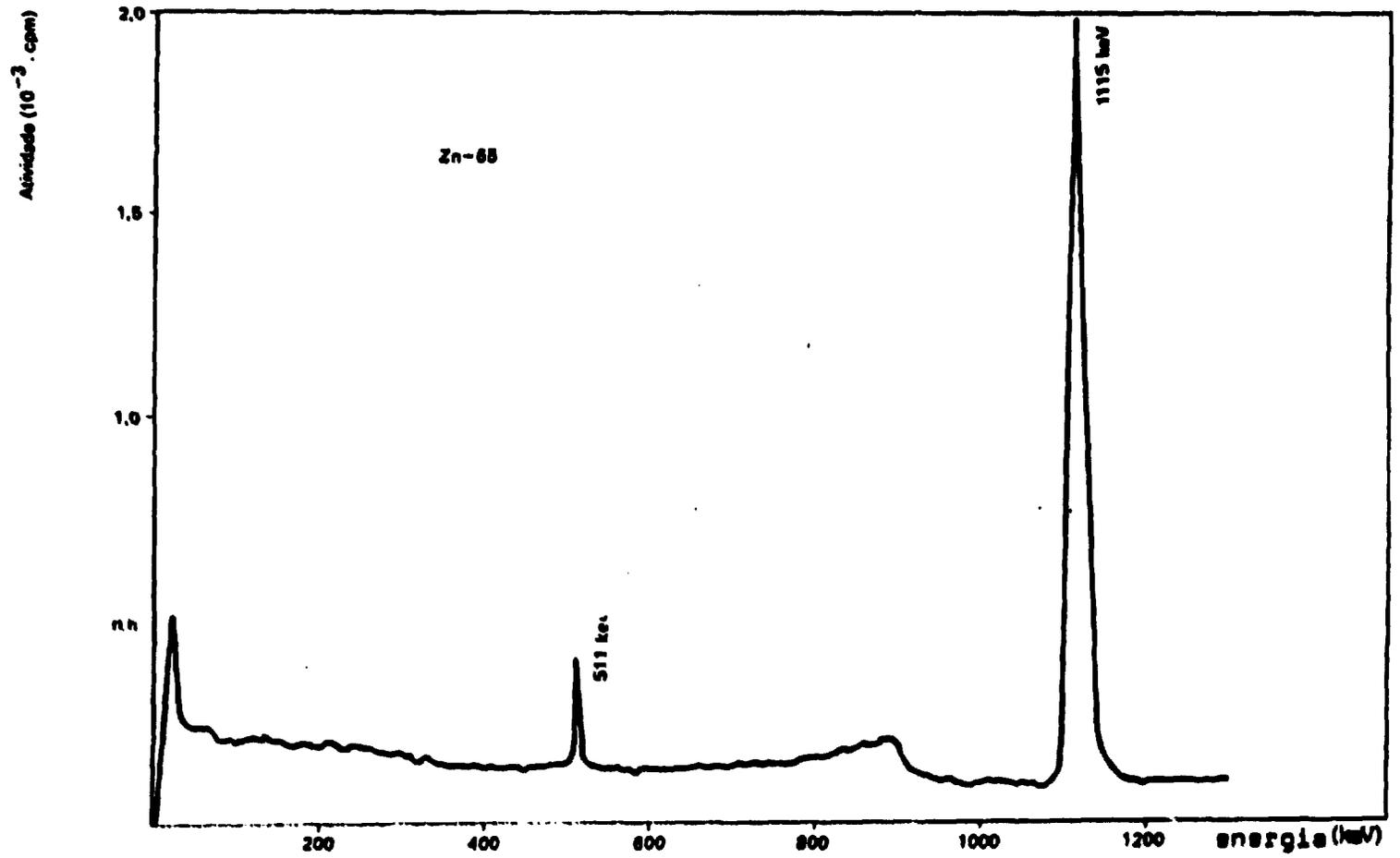
O radioisótopo de interesse para a presente pesquisa foi o zinco-65 de meia vida relativamente longa ( $T_{1/2} = 245$  dias). O espectro de raios gama obtido em um detector de Ge(Li) da solução de zinco obtido é apresentado na Figura 3.2 e confirma a pureza do material usado.

#### EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- detector Ge(Li) marca EG & G ORTEC.
- espectrômetro de raios gama, monocanal, da marca HARSHAW modelo PM 431, acoplado a um cristal de iodeto de sódio ativado com tálio [NaI(Tl)], tipo "poço", de 5,1 X 4,5 cm.
- detector de NaI(Tl) tipo planar (7,6 x 7,6 cm) marca QUARTZ & SILICE.
- medidor de pH METHRON HERISAU, modelo E-350B, com escala de leitura de 0,05 unidades de pH.
- paquímetro de fabricação japonesa marca MITUTOYO.
- balança semi-analítica, precisão 0,01 g, modelo H16, capacidade 80 g, fabricação suíça.
- termômetros (Hg) 0/60°C, marca Precision Scientific Co., PT 307037, USA, com precisão de 0,5°C.
- condutivímetro marca THOMAS, modelo 275, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, USA.
- compressores de ar marca Beta 110 V.
- termostato com aquecedor acoplado, marca Vigo-Flex, 110-150 W.

FIGURA 3.2

Espectro de Raios Gama da Solução de Zinco Radioativo



Sob a denominação de bioensaios, temos diversas modalidades de estes, entretanto para a presente pesquisa a escolha recaiu nos estes de bioacumulação.

Há tres tipos de procedimento experimental utilizados para os estes de bioacumulação que variam de acordo com os objetivos propostos:

- Estático
- Semi-estático
- Fluxo contínuo

O tipo de procedimento escolhido para atender os objetivos propostos nesta dissertação foi o estático, ou seja, uma vez introduzida a substância a ser testada e mantidos constantes os parâmetros físico-químicos a água não é renovada até o fim do teste.

Os ensaios biológicos escolhidos foram divididos de acordo com o período de exposição em tres grupos, assim denominados:

- experimento de curta duração (96 h ou 5 dias)
- experimento de média duração (18 dias)
- experimento de longa duração (30 dias)

Os testes foram realizados em recipientes de borossilicato, medindo 30 cm X 20 cm X 20 cm com capacidade total de 10 litros (Figura 3.3).



FIGURA 3.3 - Vista geral da caixa térmica onde foram realizados os testes de bioacumulação.

O sistema recebeu aeração constante por meio de um compressor de ar que promovia agitação e circulação da água. Uma pedra porosa distribuía no fundo do recipiente bolhas de ar diminutas e regulares.

Durante o período de aclimação (15 dias) em tanques com capacidade para 50 litros, com aeração constante, os indivíduos foram alimentados com ração comercial liofilizada de dois tipos diferentes. O alimento era fornecido uma vez ao dia.

Após esse período selecionava-se da população estoque indivíduos com cerca de 20 a 25 mm de comprimento total, transferindo-os para recipientes de vidro semelhantes aos dos testes (Figura 3.4).



FIGURA 3.4 - Bateria de aquários utilizados para separação e triagem dos organismos para os experimentos.

Tal procedimento era necessário para se verificar em primeiro lugar se os peixes escolhidos estavam em boas condições e aptos para as condições do teste, e em segundo, para adaptar os indivíduos às novas condições e não sofrerem choque térmico.

Todos os recipientes de teste foram cobertos com tampas de vidro revestidas com papel alumínio para se evitar perda do líquido por evaporação e por agitação do ar comprimido. Por outro lado, esta cobertura protegia os peixes de estímulos externos a fim de não excitá-los e com isso produzir resultados incompatíveis com a realidade, bem como evitar a camuflagem.

Os peixes não foram alimentados nas 48 horas que precederam o início do teste e foram alimentados de duas a três vezes por semana durante o período de testes. A limpeza dos recipientes dos testes que incluía retirada de material residual (excretas) era realizado de duas a três vezes por semana com o auxílio de um sistema de sifonagem onde foi empregada uma pera e uma pipeta volumétrica de 25 ml.

O número de indivíduos por aquário variou de acordo com o tempo de exposição proposto para cada teste, não ultrapassando o limite indicado pelas agências internacionais de padronização (ISO, 1982 e Standard Methods, 1976).

Para os bioensaios de absorção de curta duração (5 dias) a cada intervalo de tempo pré determinado (24 h), os peixes eram retirados dos aquários, enxaguados em três banhos consecutivos e imediatamente sacrificados por congelamento em nitrogênio líquido. Tal procedimento realizado de uma única vez evita a perda do zinco por movimentos espasmódicos e por excretas. Em seguida os peixes eram pesados em balança analítica e sua atividade determinada em um detector de NaI(Tl) tipo planar (7,6 x 7,6 cm) marca QUARTZ &

## SILICE.

Em outros testes de curta duração para verificar a absorção e eliminação nos testes de média e longa duração, foram utilizados peixes vivos sem sacrificá-los (alternativa usada quando as condições clínicas eram desfavoráveis à população dos organismos e a quantidade disponível era menor).

Após receberem o banho (3 vezes) para a retirada do excesso de água com traçador, os indivíduos eram colocados em tubos de contagem contendo 3 ml de água e levados para a sala de contagem onde se realizava a medida utilizando-se um detector de NaI(Tl) tipo poço (5,1 x 4,5 cm) marca HARSHAW.

Uma aliquota de água (1 ml) também foi coletada e contada.

Tubos de plástico de 12 cm de altura e com capacidade para 15 ml foram utilizados para a contagem dos organismos e da água, sendo o tempo de contagem de 1 minuto.

Ao término das contagens promovia-se a pesagem dos indivíduos, que eram posteriormente utilizados nos experimentos. Tal procedimento seria repetido a cada intervalo de tempo pré determinado.

Para os experimentos de eliminação do zinco, transferiu-se os indivíduos contendo tal elemento para um sistema de água descontaminada após terem sido submetidos por um período de absorção de 5 dias (experimento de curta duração), 18 dias (experimento de média duração) e 30 dias (experimento de longa duração). Nestes 3 tipos de testes as amostras foram contadas durante 1 minuto usando-se um detector de NaI(Tl) tipo poço (5,1 x 4,5 cm) marca HARSHAW, utilizando-se as mesmas condições já descritas anteriormente.

O parâmetro utilizado para se quantificar a acumulação foi o

fator de concentração (FC) que é definido como sendo a razão entre a concentração do zinco-65 no peixe e a concentração média na água:

$$FC = \frac{\text{conc. de zinco no peixe (cpm/g)}}{\text{conc. média de zinco na água (cpm/l)}}$$

Para a análise dos resultados dos testes de eliminação o parâmetro utilizado para se quantificar a eliminação do zinco-65 foi obtido comparando-se a atividade presente no peixe no decorrer do experimento com a atividade inicialmente retida.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão feitas inicialmente algumas considerações sobre a qualidade da água no local de coleta, em seguida serão apresentados os resultados obtidos nos testes de bioacumulação e eliminação de curta, média e longa duração.

##### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA DE COLETA DOS PEIXES

Os parâmetros físicos e químicos analisados encontram-se representados na Tabela 4.1 e referem-se aos resultados de quatro coletas realizadas durante o ano de 1988 nos meses de janeiro, junho, outubro e dezembro. Devido às pequenas dimensões do lago, as variáveis dos parâmetros físicos e químicos da água não diferem muito entre si.

Pode-se observar na Tabela 4.1 que a temperatura da água

manteve-se igualmente elevada nos meses de dezembro e janeiro de 1968, situando-se entre 28 e 29°C, atingindo seu valor mais baixo em junho, quando foi obtida a temperatura de 15°C. Em seguida houve um aumento acentuado em outubro, quando foi registrada a temperatura de 23°C.

Associada a esta variável tão importante para a coleta dos peixes encontra-se a variável climática. Assim, dias de baixa intensidade luminosa e com ventos, propiciaram a diminuição quantitativa da população da espécie de peixes selecionada para os testes.

Observando-se os indivíduos tanto na fase adulta, como juvenil de janeiro a dezembro de 1968, foi constatada a formação de cardumes. Por outro lado, durante observações tanto de campo quanto de laboratório, pode-se inferir que a fase juvenil e adulta possuem hábitos diurnos.

TABELA 4.1 - Qualidade da água no local de coleta.

(Janeiro, junho, outubro e dezembro de 1988)

Parâmetros físicos e químicos	Valores registrados			
	Jan	Jun	Out	Dez
Temperatura (°C)	28	15	23	25
O.D. (mg/l)	6,8	7,5	6,5	7,0
pH	6,6	6,9	6,5	6,8
Alcalinidade (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	57	51	53	56
Dureza total (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	48	43	45	49
Condutividade (umhos/cm)	123	114	110	112
Turbidez (NTU)	4,3	2,8	2,5	3,8
Cor (mg FT/l)	42	30	50	60

Foram utilizados nos testes organismos machos e fêmeas. Logo após a introdução dos peixes nas condições do teste foi observado não ter havido percepção do poluente e os animais nadavam normalmente e com o passar do tempo não se constatou comportamento anômalo nos indivíduos submetidos ao teste.

As variáveis utilizadas na análise de bioacumulação e eliminação foram as seguintes:

- para absorção foi utilizado o fator de concentração
- para eliminação foi usada a relação entre a atividade presente no peixe no decorrer do experimento e a atividade inicialmente retida.

#### 4.2.1 TESTES DE CURTA DURAÇÃO

Os testes de curta duração foram utilizados tanto para a absorção quanto para eliminação do zinco. Nos testes de absorção o tempo de exposição dos organismos às condições de experimento não ultrapassou 96 horas. Quanto aos testes de eliminação o tempo foi da ordem de 120 horas.

##### 4.2.1.1 TESTE DE BIOACUMULAÇÃO

O período de aclimação dos organismos às condições dos testes de absorção foi de 6 horas em recipientes especiais (Figura 3.4) e o número de organismos utilizados foi de 485 entre machos e

fêmeas. Inicialmente foram realizados experimentos com machos e fêmeas separadamente, sendo que os pesos variaram de 60 mg a 370 mg para organismos fêmeas e de 116 mg a 250 mg nos organismos machos. Os resultados obtidos se encontraram nas Tabelas 4.2 e 4.3 e nas Figuras 4.1 e 4.2 e 4.3.

Verifica-se que ocorre absorção do zinco pelos peixes durante todo o período de exposição.

A mais alta taxa de absorção do zinco observada ocorreu por volta de 70 horas de exposição, independente do sexo do peixe.

Outro fato a ser ressaltado é que sob as mesmas condições de temperatura, pH e dureza da água aparentemente não existe marcada diferença entre a absorção que ocorre nos exemplares machos e fêmeas. Todavia, é preciso enfatizar que as fêmeas apresentam após 24 horas um fator de concentração levemente superior ao dos machos (Figura 4.3). Possivelmente essa diferença na absorção esteja ligada ao metabolismo dos peixes que varia de uma espécie para outra e em indivíduos da mesma espécie (Nomura, 1977).

É fato conhecido que as fêmeas possuem um tecido adiposo que facilita a absorção e a retenção de metais e do zinco em particular, visto que os metais pesados têm afinidade por esse tipo de tecido que por sua vez tem capacidade de armazená-los. Fato que ainda deve ser levado em conta é que a velocidade do metabolismo entre indivíduos machos e fêmeas de algumas espécies é diferente, pois na fase de crescimento e maturação sexual as fêmeas mais volumosas e vagarosas utilizam sua energia para o crescimento do corpo e gônadas, produção de óvulos e transporte de alimento para desenvolver os embriões.

TABELA 4.2 - Valores do fator de concentração (\*) do zinco-65 para peixes fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo de exposição (96 horas).

Tempo de exposição (horas)	Fator de concentração cpm/g (F.C. = $\frac{\text{cpm/g}}{\text{cpm/ml}}$ )	Desvio padrão
1	6,2	2,6
24	10,6	5,8
48	8,4	3,9
72	16,1	8,4
96	6,6	2,3

(\*) média de 19 determinações

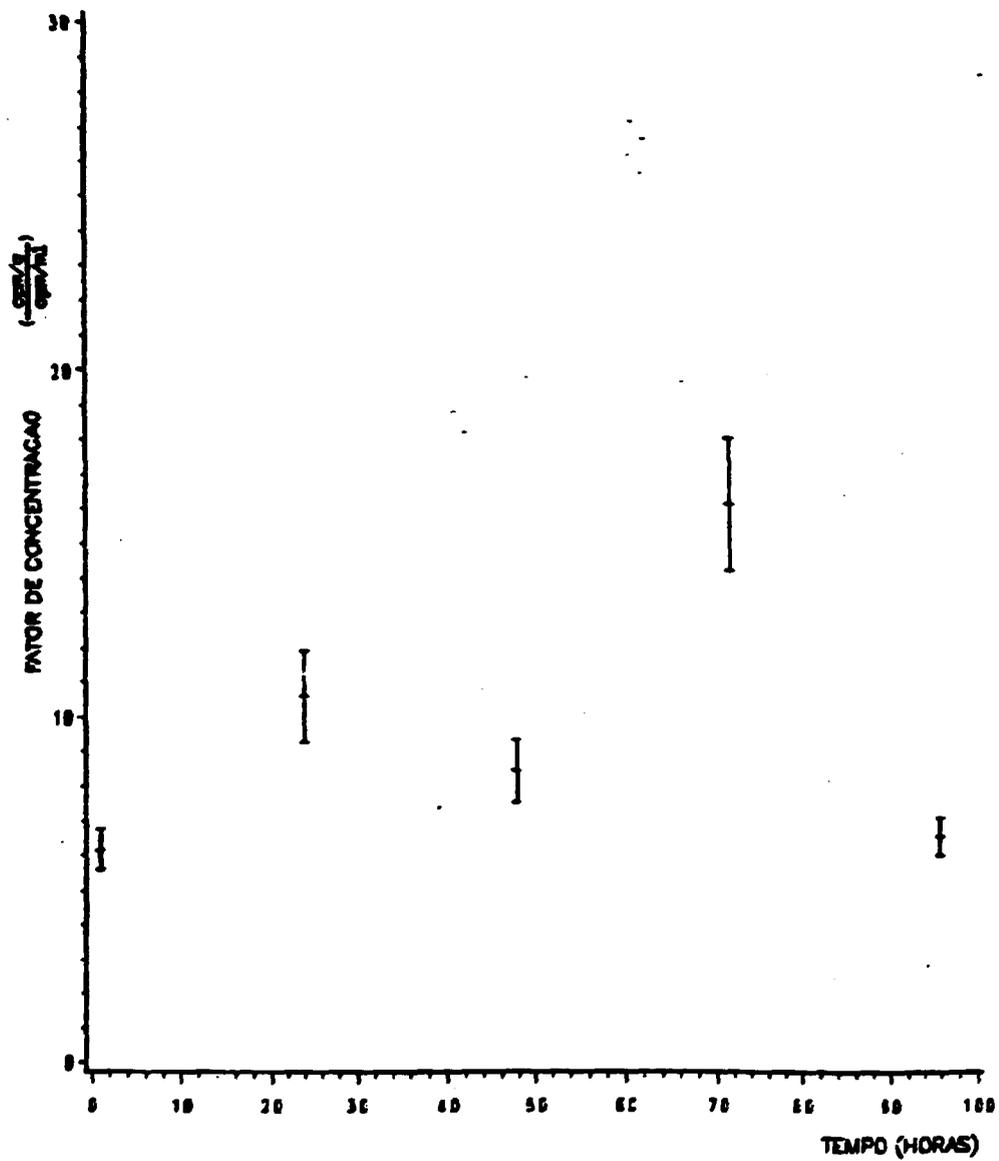


FIGURA 4.1: fator de concentraçao do zinco-65 para peixes fêmeas da especie *Poecilia Reticulata* em funçao do tempo de exposiçao (95 horas). Cada ponto e barra vertical representa a media e o desvio padrao de 10 individuos

TABELA 4.3 - Valores do fator de concentração (K) do zinco-65 para peixes machos da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo de exposição (56 horas).

Tempo de exposição (horas)	Fator de concentração (F.C. = $\frac{\text{cpm/g}}{\text{cpm/ml}}$ )	Desvio padrão
1	5,1	1,5
24	6,3	1,5
48	9,1	3,4
72	13,7	2,6
96	6,0	1,5

(K) média de 19 determinações

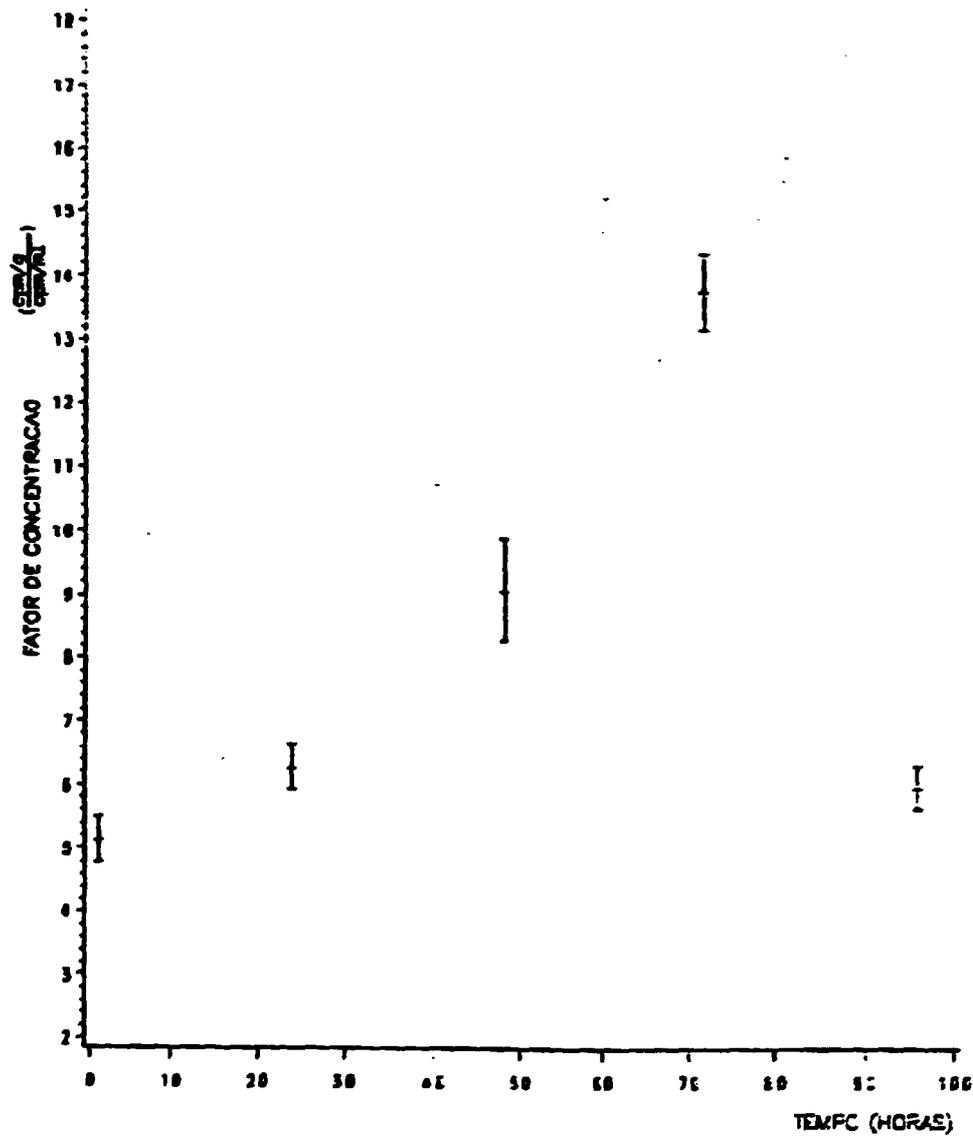


FIGURA 4.2: fator de concentraçao do zinco-65 para peixes mochos da especie *Psectis Reticulata* em funçao do tempo de exposiçao (±6 horas). Cada ponto e barra vertical representa o meio e o desvio padrao de 15 individuos

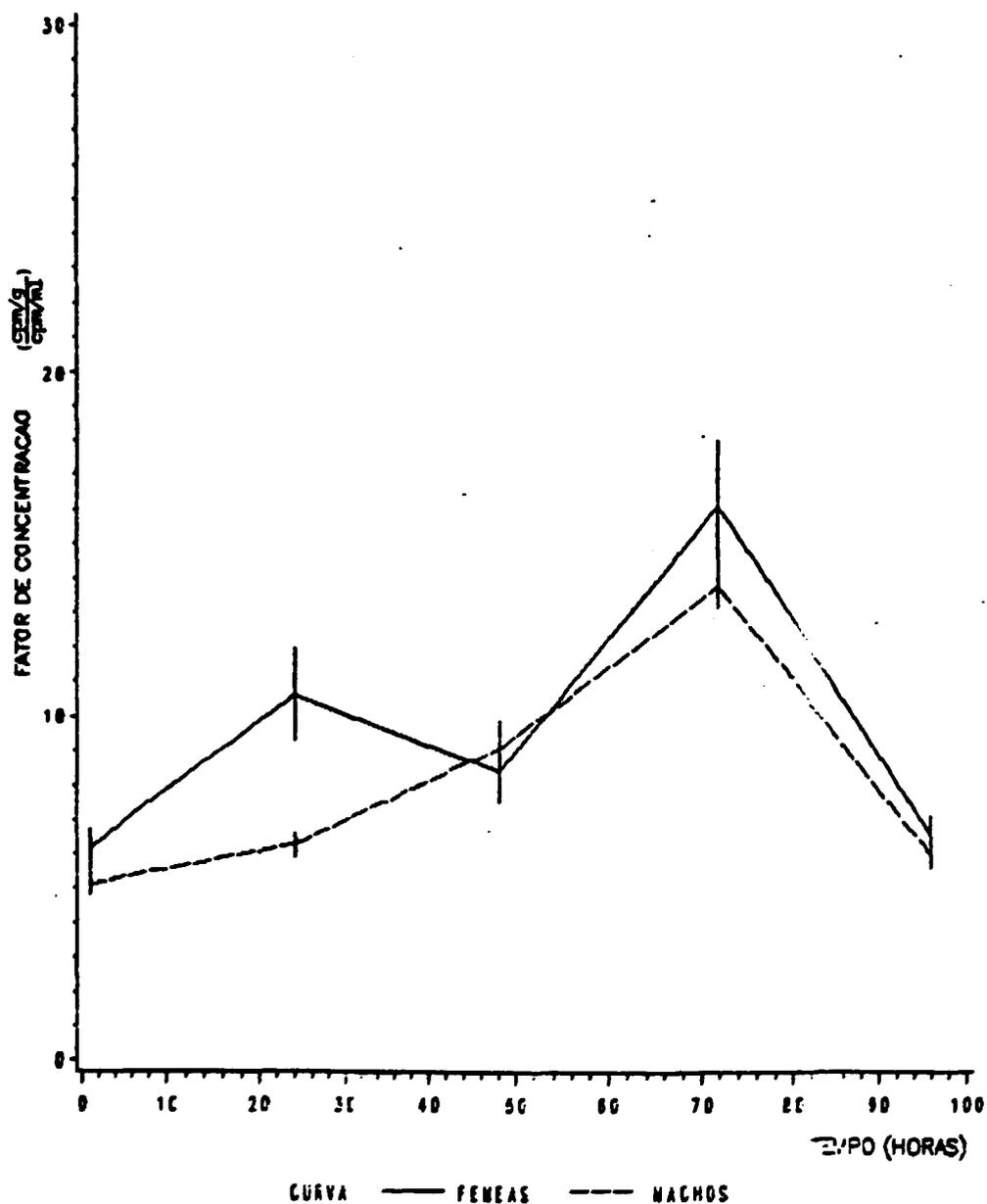


FIGURA 4.3: fator de concentraçao do zinco-65 para peixes machos e fêmeas (separados) da espécie *Pseudorasbora parva* em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 10 indivíduos.

Nos indivíduos machos mais ágeis a energia empregada no crescimento é desviada para a nataçãõ na procura de fêmeas férteis, não armazenando por conseguinte quantidades apreciáveis de gordura (Nomura, 1977). Pode-se notar um dimorfismo sexual em relação ao tamanho e este pode influir no comportamento de absorçãõ do zinco.

Kudo (1976) constatou em estudos de laboratório que em geral peixes jovens de espécie Poecilia reticulata acumularam altas concentrações de mercúrio rapidamente (principalmente as fêmeas) durante um período de exposição de 60 dias.

Em geral, espécies mais ativas e estruturalmente mais complexas apresentam taxas metabólicas mais altas como é o caso das fêmeas da espécie ora estudada.

Assim para as discussões acerca das diferenças de comportamento entre machos e fêmeas deve-se argumentar e levar em conta os vários aspectos do dimorfismo sexual, hábitos, bem como a fisiologia dos mesmos.

O fato de encontrarmos indivíduos de mesma espécie e do mesmo sexo com diferentes taxas de absorçãõ deve-se provavelmente a tres fatores:

- algumas mudanças nas práticas laboratoriais que podem modificar as características de cada população utilizada.
- a sensibilidade específica de cada população (resistente ou não) que pode eventualmente acarretar diferenças no comportamento (Newly, 1979)
- as diferenças de comportamento de exemplares de uma mesma espécie submetidos a ensaios biológicos.

Sparks e col. (1973) observaram diferenças de comportamento importantes em peixes confinados em testes de laboratório. Notaram

que o comportamento sempre dependeu de estímulos externos e estes traduziram-se em cada exemplar em ritmos peculiares. Estes autores constataram que indivíduos de comportamento submisso sobreviveram menos tempo que os de comportamento dominador possivelmente por causa da condição de estresse a que eram submetidos pelas frequentes investidas dos exemplares mais agressivos, portanto, existe uma relação submissos-dominadores que pode constituir também uma fonte de variabilidade de comportamento dos peixes em ensaios biológicos.

Segundo Warren (1971) esse comportamento não é atributo muito constante estando sujeito a mudanças com o desenvolvimento e a idade do organismo durante todo o seu ciclo de vida.

Verifica-se pela análise dos resultados (Figura 4.3) que o desvio padrão obtido, de uma maneira geral, é consideravelmente alto quando não se trabalha com indivíduos com massa e tamanhos homogêneos.

Ferreira e col. (1982) e Kudo (1976) utilizando a mesma espécie escolhida para este trabalho, assinalaram que sob o ponto de vista metodológico, bem como dos resultados é preciso muito cuidado na amostragem de indivíduos que serão submetidos aos testes. Os mesmos autores constataram que quando ocorre marcada diferença de peso e tamanho entre os indivíduos, os desvios padrão aumentavam, entretanto diminuíam à medida que a massa era mais uniforme.

Repetiu-se então o experimento colocando-se fêmeas e machos no mesmo recipiente de teste, mas tomando-se mais cuidado na amostragem. Para isso foram selecionados organismos que tinham aproximadamente o mesmo peso e tamanho.

Após esta prática verificou-se que indivíduos machos e fêmeas

tinham comprimento total de 20 a 25 mm e pesos entre 165 a 188 mg. Verificou-se pelos resultados obtidos neste teste (Tabela 4.4 e Figura 4.4) que os desvios padrão tornaram-se sensivelmente menores e confirmou-se a tendência da espécie de absorver o zinco notadamente por volta da 70<sup>a</sup> hora.

De uma maneira geral verifica-se que existe uma tendência das várias espécies de acumular o zinco, o comportamento de absorção de diferentes órgãos, entretanto, varia de uma espécie para outra. A seguir serão apresentados alguns trabalhos encontrados na literatura que estudam a absorção do zinco em diferentes órgãos de várias espécies, em experimentos de duração relativamente curta (2 a 15 a 20 dias).

Mattihiessem e col. (1977) constataram que peixes da espécie Gasterosteus aculeatus expostos a 1 mg/l de zinco em água destilada, dose letal aguda em 24 horas, absorveram grande quantidade de zinco nas brânquias após 16 horas de exposição (fator de concentração = 5,1); seguida do fígado (3,8); rins (3,2); intestinos (2,4); carcaça (1,6) e gônadas (0,8).

Baudin (1967) e Ueda e col. (1981), comprovaram que o fígado do peixe é o segundo compartimento de maior absorção, prende-se no fato de o zinco combinar-se com vários constituintes deste órgão, entre eles metaloproteínas, especialmente metaloenzimas. Tal comportamento varia de acordo com a espécie considerada bem como com as diferentes formas de absorção e ainda com as taxas de retenção do metal entre peixes da mesma espécie.

A taxa metabólica do fígado é mais elevada que dos músculos, por isso qualquer mudança na relação entre acumulação e excreção ocorre no fígado antes de se manifestar nos músculos.

Edwards (1967) em estudos realizados com peixes da espécie

Pleurocnetes platessa L., observou que o estômago e intestinos são órgãos que possuem as mais altas concentrações de zinco, seguida da pele, esqueleto, músculos, fígado, rins e sangue.

Segundo o pesquisador tal fato está ligado a certas enzimas principalmente do intestino, que contém zinco em suas estruturas.

**TABELA 4.1 - Valores do fator de concentração do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo de exposição (96 horas).**

Tempo de exposição (horas)	Fator de concentração cpm/g (F.C. = $\frac{\text{cpm/g}}{\text{cpm/l}}$ )	Desvio padrão
1	2,73	0,25
24	4,59	0,45
48	4,90	0,42
72	13,67	6,51
96	4,26	0,34

(\*) média de 15 determinações

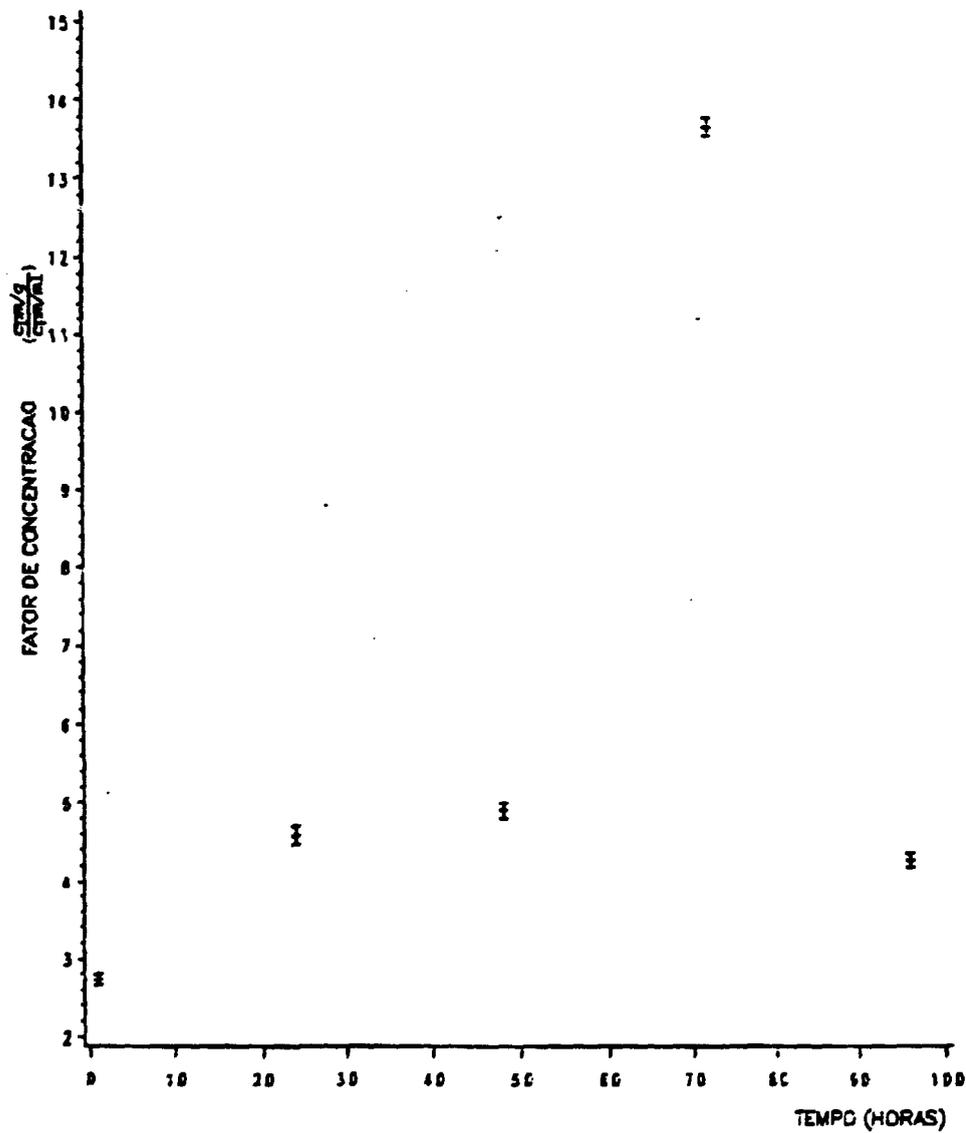


FIGURA 4.4: fator de concentração do zinco-65 por peixes da espécie *Poecilia Reticulata* em função do tempo de exposição (96 horas). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 15 indivíduos.

Para o estudo de eliminação do zinco nos experimentos de curta duração, peixes foram transferidos para recipientes contendo água isenta de zinco após um período de permanência de 96 horas em água contendo zinco-65.

As excretas dos peixes foram removidas diariamente a fim de evitar reabsorção.

Os resultados obtidos que se encontram na Tabela 4.5 e Figura 4.5, mostram que dentro de um período de 120 horas de eliminação os organismos liberam o zinco lentamente atingindo apenas 15 % do total absorvido.

Do ponto de vista ecológico-sanitário esses resultados trazem informações muito importantes pois se transportarmos tal fato para o ambiente natural, os peixes, locomovendo-se de uma região poluída para outra não poluída verificaremos que não há eliminação total nesse intervalo de tempo do referido metal previamente absorvido. Isto implica dizer que se tal organismo serve como alimento em uma cadeia alimentar esse metal passará por vários níveis tróficos, atingindo o último elo com concentrações mais elevadas e provavelmente tóxica para outros organismos.

Por outro lado, quando uma fonte poluidora é contínua, mesmo apresentando baixas concentrações de um determinado poluente cumulativo, pode ocorrer uma concentração residual muito elevada podendo ocorrer episódios de toxicidade aguda.

Edwards (1967) constatou uma perda de cerca de 35 % de zinco-65 em 7 dias, após dois dias de acumulação a partir da água na espécie marinha "solha". Todavia após permanecerem por mais de 70 dias em água descontaminada os organismos eliminaram apenas

cerca de 15% do zinco restante.

Lebedeva e Kuznetsova (1969), transferindo alevinos de carpas após permanência de quatro meses em água contendo zinco, para água isenta deste elemento por dois meses, constataram que durante esse período os peixes retiveram quase todo o zinco acumulado, sendo que suas concentrações nos tecidos e órgãos permaneceram praticamente as mesmas.

Ferreira e col. (1962), trabalhando com a mesma espécie usada nesta dissertação, demonstraram que o mercúrio absorvido é totalmente eliminado num período de 120 horas (5 dias), quando transferidos para água isenta de mercúrio.

Kudo (1976) constatou que peixes da espécie Poecilia reticulata liberaram mercúrio rapidamente quando transferidos para água isenta do metal em estudo.

Verificou também que o mercúrio é prontamente liberado pelas fezes e lentamente por meio de outros componentes do corpo.

Nos experimentos dessa dissertação também constatou-se uma perda de zinco para a água através das excretas; por meio da medida de 1 ml de água do aquário que continha a maior parte das excretas presentes.

O valor médio encontrado nessas amostras foi de 2000 cpm, enquanto que não foi detectada qualquer atividade nas alíquotas de 1 ml de água isenta de excretas extraídas do mesmo recipiente.

Esses resultados obtidos experimentalmente, entretanto, não são suficientes para se afirmar que a via principal de eliminação é a excreta devido ao fato da atividade encontrada (≈ 2000 cpm) ser decorrente das excretas de toda a população existente no aquário e do fator de diluição da alíquota de água medida ser muito grande (1:10000).

Os resultados de eliminação obtidos nos experimentos de curta duração confirmaram os resultados dos outros autores (Edwards, 1957; Lebedeva e Kuznetsova, 1969), isto é, a eliminação do elemento zinco é lenta não só para a espécie *Poecilia reticulata* como para outras espécies testadas que inclusive fazem parte da dieta alimentar. Por outro lado, ao se comparar a eliminação do zinco com a de outros metais tóxicos pela mesma espécie verifica-se que a retenção do zinco é mais elevada do que, por exemplo, o mercúrio (Kudo, 1976; Ferreira e col., 1982).

Como o intervalo de tempo utilizado neste experimento para a absorção e eliminação foi relativamente curto, optou-se por se realizar novos experimentos com intervalos de tempo maiores para se poder confirmar as tendências preliminares obtidas.

Tabela 4.5 - Eliminação do zinco-65 após 96 horas de acumulação da água para peixes da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo (h).

Cada ponto representa a média de 20 determinações.

Tempo (h)	Atividade no peixe (cpm/mg)	% da atividade inicial retida
1	15,41	100
24	14,63	94,9
48	14,19	92,0
72	13,88	90,0
96	13,30	86,8
120	12,97	84,1

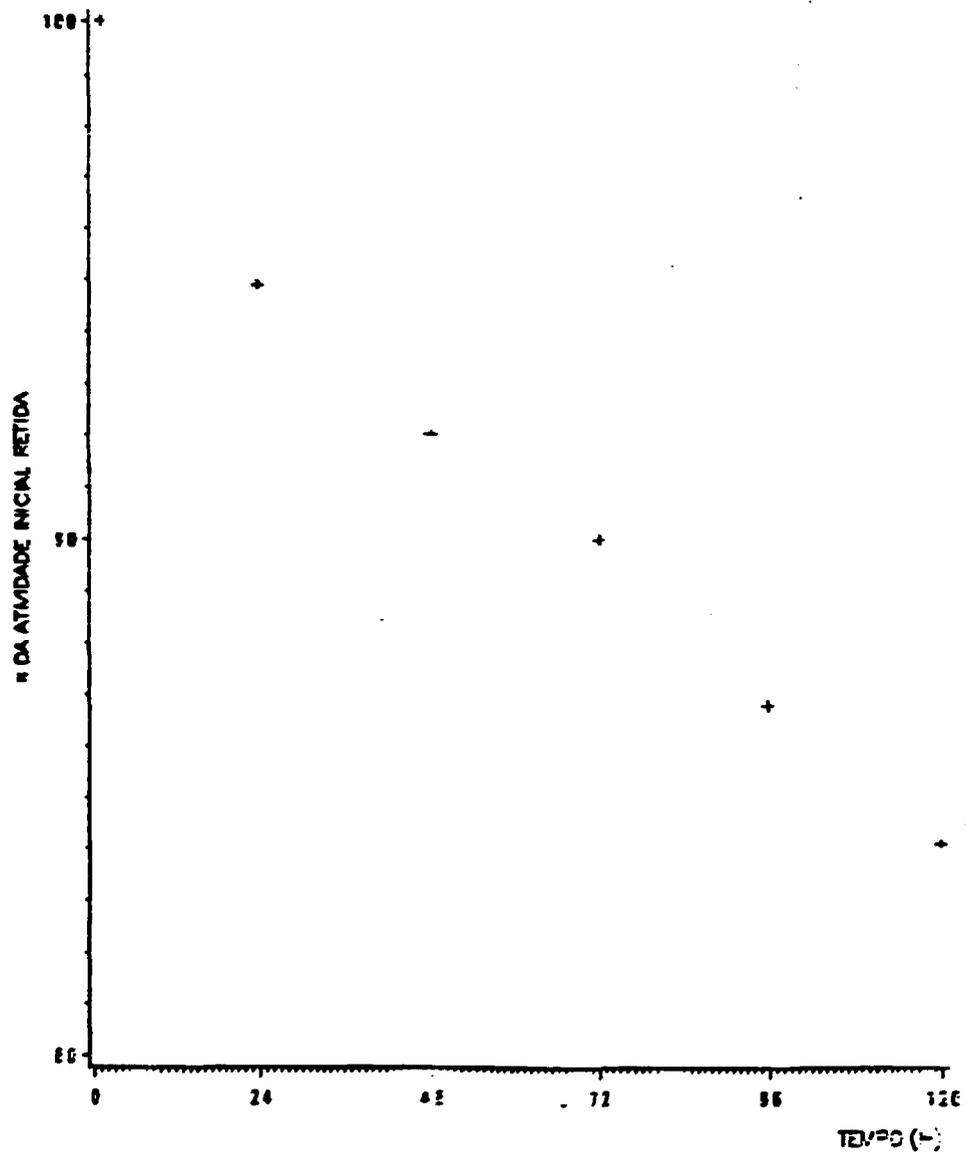


FIGURA 4.5: Eliminação do zinco-65 por células da espécie *Pencilia reticulata* em função do tempo, após 66 horas de acumulação da água

Os testes de média duração foram utilizados tanto para verificar a absorção quanto a eliminação do zinco. Neste experimento o tempo de exposição dos organismos foi de 18 dias. A aclimação dos organismos às condições do teste de absorção foi de 12 horas. O peso dos organismos variou de 180 a 190 mg, tendo sido utilizados um total de 720 indivíduos entre machos e fêmeas.

#### 4.2.2.1 TESTES DE BIOACUMULAÇÃO

Os resultados dos testes de média duração encontram-se na Tabela 4.8 e o gráfico correspondente na Figura 4.6. Observando-se o gráfico da Figura 4.6 constata-se que ocorre uma absorção acentuada do zinco pelos peixes nos onze primeiros dias de exposição.

A partir do 11<sup>o</sup> dia até o final do experimento, ou seja, o 18<sup>o</sup> dia, pode-se perceber uma tendência à estabilidade indicando o estabelecimento de um patamar. Nesta série de experimentos os exemplares machos e fêmeas foram analisados conjuntamente, tendo-se obtido desvios padrão acentuadamente menores se comparados aos experimentos de curta duração onde os peixes machos e fêmeas foram analisados separadamente (Figura 4.3). Aqui também tal fato está relacionado com a seleção dos organismos para o teste que apresentaram massas mais homogêneas.

A tendência à estabilidade após 11 dias de exposição foi observada também em experimentos realizados por Ferreira e col. (1982) utilizando a mesma espécie de peixe sob a ação do

Outros autores (Lebedeva e Kuznetsova, 1969), estudando a absorção do zinco pelas carpas verificaram que a acumulação decresce na seguinte ordem: vísceras, brânquias, esqueleto e músculos.

Slater (1961) encontrou uma acumulação maior de zinco nas guelras do que em qualquer das outras partes (musclicatura, vísceras, etc.) estudadas em 3 espécies de trutas, indicando uma atividade metabólica maior nas guelras do que em qualquer outra parte.

Estudos realizados por Pentheath (1973) com o "linguado" para conhecer o comportamento de absorção do zinco-65 mostraram que este elemento se encontrava distribuído por igual entre os ossos e a pele, entretanto foram encontradas concentrações mais baixas nos músculos.

Estudos de localização feitos por Saiki e col. (1955) com relação ao zinco-65 em vários órgãos de peixes marinhos demonstraram que após a explosão atômica em Bikini a maior quantidade deste elemento encontrava-se no baço com quantidades decrescentes (por ordem) nos rins, fígado, cecos pilélicos, coração, guelras, intestinos, parede gástrica, ovário, testículos, músculos vermelhos, pele, vértebras e músculos brancos.

Estudos realizados por Miura e col. (1958) com três espécies de trutas indicaram que a concentração do zinco foi acentuadamente mais evidente no plasma sanguíneo assinalando contudo que a máxima concentração após os testes encontrava-se nos olhos.

De uma maneira geral os trabalhos apresentados na literatura têm uma preocupação maior em analisar a concentração do zinco nos diversos órgãos dos peixes. No nosso trabalho entretanto não foi

seletividade de absorção dos diversos órgãos, devido às pequenas dimensões da espécie escolhida.

Deve ser ressaltado porém que o conhecimento da concentração total de zinco absorvida é importante, pois tal espécie é utilizada como alimento para níveis tróficos superiores.

Hodson (1975) trabalhando com espécies de salmão do Atlântico Norte, submetidos a testes onde as temperaturas eram de 3°C, 11°C e 19°C observou que a absorção do zinco foi sucessivamente maior à medida que a temperatura aumentava. Tal fato pode ser ainda corroborado quando se examina os trabalhos de Miura e col. (1956), cujos testes com o peixe dourado foram realizados variando-se a temperatura, indicando que em temperaturas superiores a 20°C a absorção era maior. Mas o fato que parece mais interessante neste trabalho prende-se à observação de que a melanina (pigmento de cor escura) pode absorver maior quantidade de zinco.

Ainda que não se tenha realizado determinações que comprovem tais fatos com a espécie do presente trabalho, pode-se inferir que esses fatores possam ser relevantes uma vez que os peixes desta espécie apresentam concentrações localizadas de melanina. Tais fatores poderiam ser objeto de pesquisas futuras.

TABELA 4.6 - Valores do fator de concentração (\*) do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo de exposição (18 dias).

Tempo de exposição (dias)	Fator de concentração cpm/g (F.C. = $\frac{\text{cpm/g}}{\text{cpm/l}}$ )	Desvio padrão
1	1,92	0,27
2	3,44	0,39
3	4,8	1,1
4	5,5	1,0
5	6,7	2,6
7	6,7	1,0
9	7,6	1,1
11	10,4	1,2
13	9,64	0,68
15	10,0	1,9
17	9,5	1,2
18	10,11	0,74

(\*) média de 30 determinações

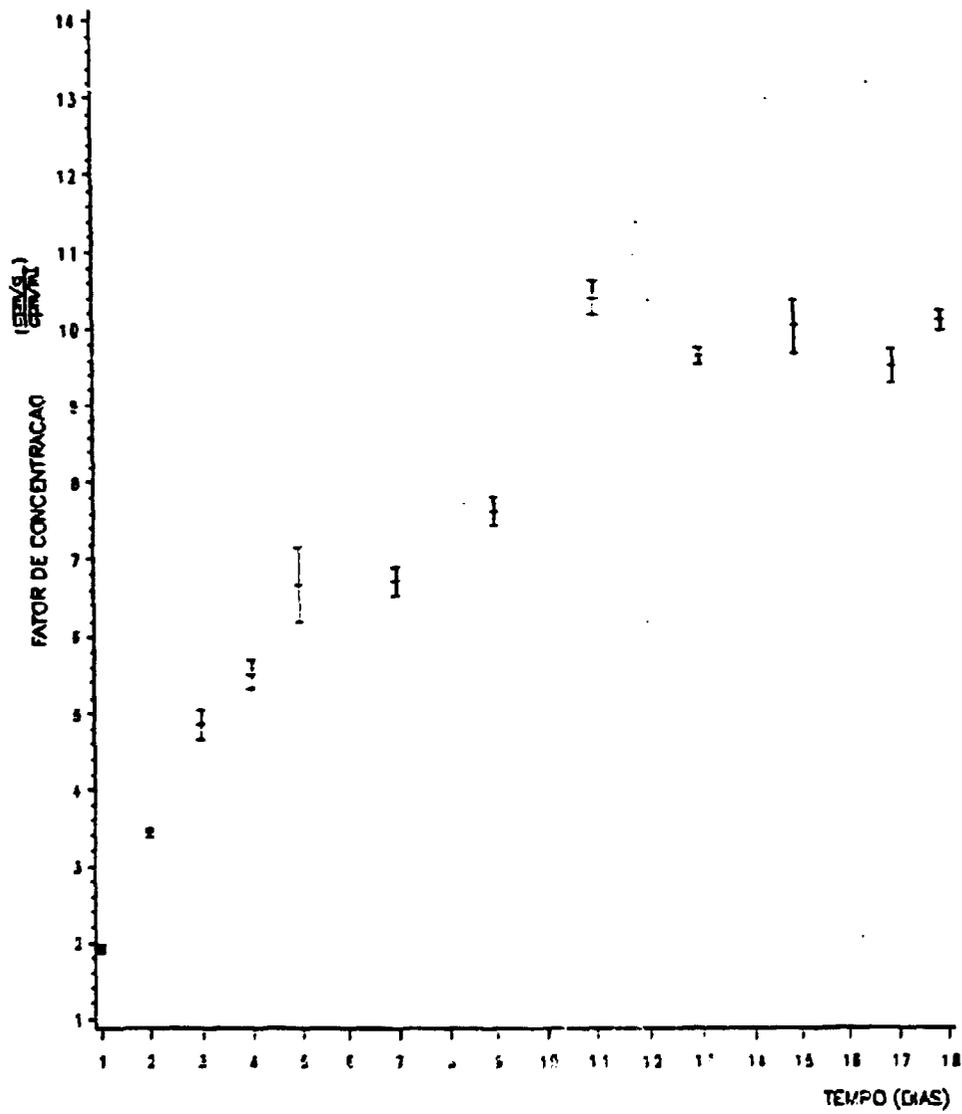


FIGURA 4.6: fator de concentração do zinco-66 para peixes da espécie *Peccilia Reticulata* em função do tempo de exposição (18 dias). Cada ponto e barra vertical representa a média e o desvio padrão de 30 indivíduos.

#### 4.2.2.2 TESTES DE ELIMINAÇÃO

Para o estudo de eliminação do zinco nos experimentos de média duração, peixes foram transferidos para recipientes contendo água (isenta de zinco) após um período de permanência de 18 dias em água contendo zinco-65.

As excretas dos peixes foram removidas diariamente a fim de evitar reabsorção.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.7 e figura 4.7. Pode-se notar uma inflexão da curva por volta do 5<sup>o</sup> dia de eliminação. Portanto nos cinco primeiros dias a eliminação é mais acentuada ( $\approx 20\%$ ), confirmando os resultados obtidos no experimento de curta duração (Figura 4.5). Após este intervalo de tempo a declividade da curva diminui obtendo-se ao final do experimento (por volta de 15 dias) uma eliminação total de 30% do zinco inicialmente absorvido. Esta tendência é confirmada por Edwards (1967) que constatou uma perda de 35% nos sete primeiros dias de eliminação seguida de 15% nos dias restantes até o final do experimento (70 dias), na espécie marinha "solha".

Matthiessen e col. (1977) ao analisarem a taxa de eliminação do zinco em peixes da espécie Gasterosteus aculeatus verificaram que esta foi maior (44% após 8 horas) nos indivíduos expostos a 5 mg/l de  $Zn^{2+}$  em água dura do que expostos em água destilada contendo 1 mg/l de  $Zn^{2+}$  (23%).

Os autores constatarem que tal fato está relacionado à ação protetora do cálcio durante o experimento.

Chipman e col. (1968) observaram uma perda cerca de 90% de zinco na espécie Lagodon rhomboides em dois dias de eliminação, após receberem uma única dose de gelatina como alimento contendo

zinco-65 (via trato digestivo). Tal perda após curto período de tempo de exposição, segundo os autores, pode resultar de contaminação da superfície interna dos intestinos. Os mesmos autores assinalaram que o tempo de exposição à atividade, também afeta o padrão de excreção.

Matthiessen e col. (1977) ao analisarem a taxa de eliminação do zinco em Gasterosteus aculeatus, constataram uma capacidade de eliminação de cerca de 75% quando a espécie foi colocada num sistema de água descontaminada por um período de tempo maior, o que não ocorre com a maioria das espécies.

Lebedeva e Kuznetsova (1969) assinalaram que o excesso de cálcio na água causa um espessamento dos tecidos em muitos organismos aquáticos. Possivelmente a menor penetração do zinco, nos órgãos e tecidos dos peixes deve-se a esse tipo de comportamento.

Portanto, segundo esses autores é preciso muito cuidado ao se comparar resultados com mesmas espécies uma vez que a composição química da água (dureza) varia de um experimento para outro.

Tabela 4.7 - Eliminação do zinco-65 após 18 dias de acumulação da água para peixes da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo (\*).  
Cada ponto representa a média de 30 determinações.

Tempo (dias)	Atividade no peixe (*) (cpm/mg)	% de atividade inicial retida
01	30,11	100
02	28,09	93,2
03	26,28	87,2
04	24,94	82,8
05	24,44	81,1
07	24,14	80,1
09	23,64	78,5
11	23,32	77,4
13	22,44	74,5
15	21,96	72,9
17	21,05	69,9
18	20,08	66,6

(\*) Média de 30 determinações

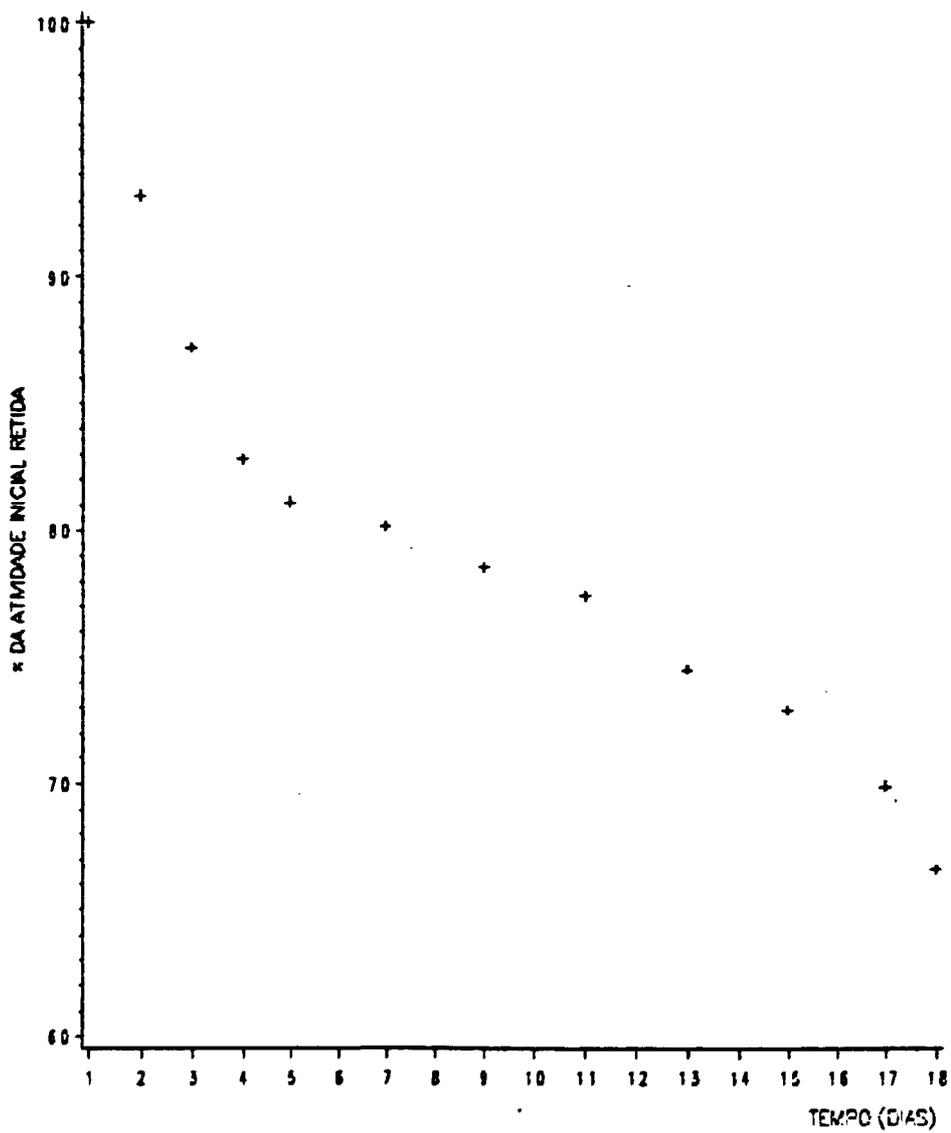


FIGURA 4.7: Eliminação do zinco-65 para peixes da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo, após 16 dias de acumulação de água.

Os testes de longa duração foram utilizados tanto para verificar a absorção quanto a eliminação do zinco. O peso dos organismos variou de 180 a 190 mg e foram utilizados um total de 650 indivíduos entre machos e fêmeas.

Neste experimento o tempo de exposição dos organismos foi de 30 dias. A aclimação dos organismos às condições do teste de absorção foi de 24 horas.

#### 4.2.3.1 TESTES DE BIOACUMULAÇÃO

Os resultados dos testes de absorção encontram-se na tabela 4.8 e o gráfico correspondente na Figura 4.8. Observando a Figura 4.8 verifica-se uma absorção do zinco pelos organismos até aproximadamente o 13<sup>o</sup> dia, tendência que confirma os resultados obtidos nos testes de média duração. Na figura 4.8, após esse intervalo de tempo a absorção tendeu à estabilidade até o final do experimento. No teste de longa duração não foi verificada a mesma tendência, os resultados obtidos por volta do 13<sup>o</sup> dia até o final do experimento foram bastante aleatórios não permitindo se chegar a mesma conclusão sobre o comportamento de absorção, especialmente se considerarmos que os respectivos desvios padrão relativos não excederam a 5%.

Observa-se a partir do 24<sup>o</sup> dia até o final do experimento uma tendência à eliminação do zinco.

Estudos realizados por Kudo (1978) utilizando a mesma espécie de organismo mostrou que a absorção do mercúrio por 4 grupos de

peixes foi semelhante durante todo o período de exposição, diminuindo gradualmente com relação ao tempo de exposição.

Entretanto se não considerarmos os desvios padrão obtidos, podemos verificar uma tendência em absorver o zinco até aproximadamente o 24<sup>o</sup> dia e a partir desta data, uma tendência em eliminar tal elemento.

**TABELA 4.8 - Valores do fator de concentração(\*) do zinco-65 para peixes machos e fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo de exposição (30 dias).**

Tempo de exposição (dias)	Fator de concentração (F.C. = $\frac{\text{cpm/g}}{\text{cpm/ml}}$ )	Desvio padrão
1	2,00	0,15
2	2,70	0,17
3	3,46	0,25
4	7,36	0,38
5	4,43	0,38
6	6,42	0,41
7	6,30	0,39
9	7,81	0,54
12	13,69	0,59
13	22,82	0,72
15	23,46	0,80
16	12,48	0,40
17	21,03	0,84
18	25,47	0,56
19	22,54	0,61
22	26,32	0,51
24	34,03	0,60
26	28,53	0,65
27	20,36	0,64
28	20,23	0,64
29	16,52	0,61
30	15,95	0,33

(\*) média de 24 determinações

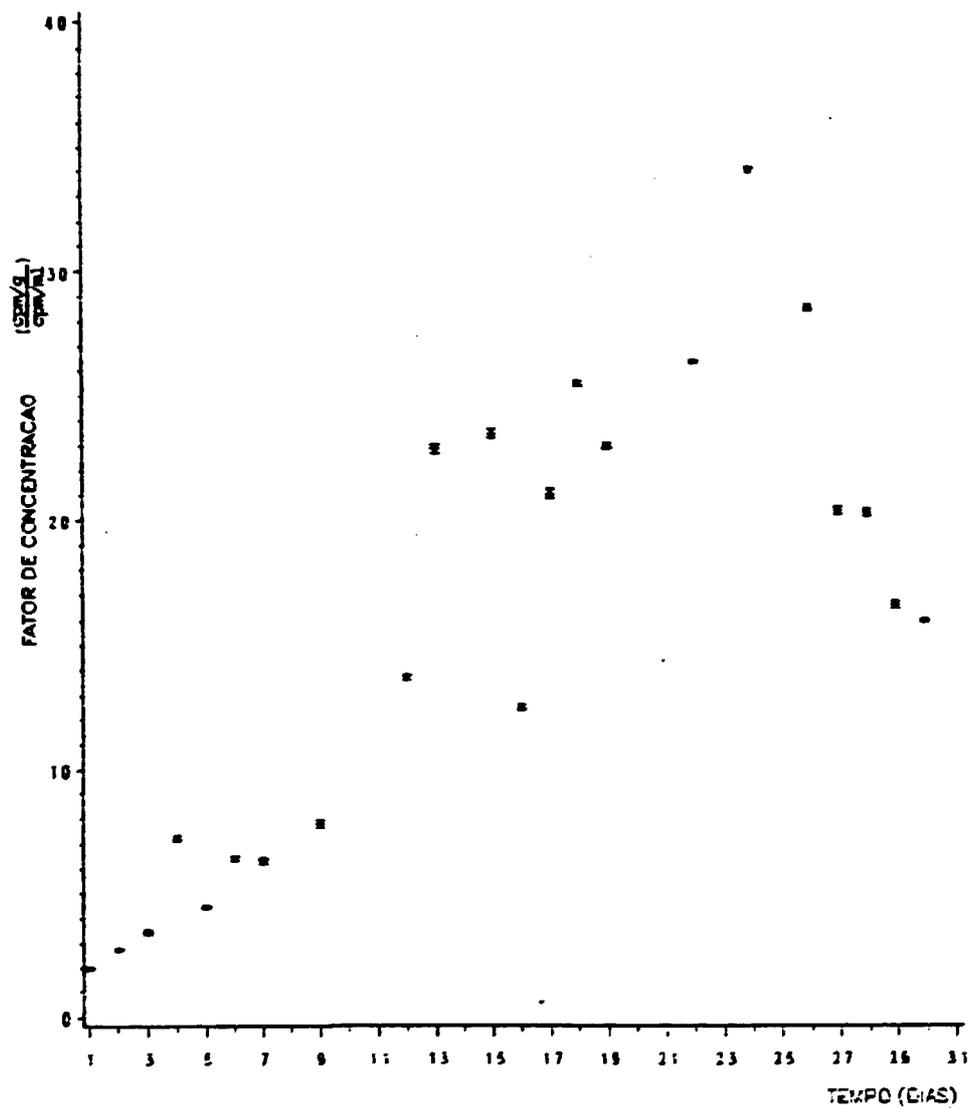


FIGURA 4.8: fator de concentraçao do zinco-65 para peixes da especie *Piceilia Reticulata* em funçao do tempo de exposiçao (30 dias). Cada ponto e barra vertical representa a media e o desvio padrao de 24 individuos.

#### 4.2.3.2 TESTES DE ELIMINAÇÃO

Para o estudo de eliminação do zinco nos experimentos de longa duração, peixes foram transferidos para recipientes contendo água isenta de zinco após um período de permanência de 30 dias em água contendo este elemento.

As excretas dos peixes foram removidas diariamente a fim de evitar reabsorção.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.9 e Figura 4.9. Verifica-se que são necessários 30 dias para que ocorra uma eliminação total de 70 % do zinco absorvido.

Os resultados obtidos confirmam aqueles apresentados nos experimentos de curta e média duração, ou seja,  $\approx 20$  % do zinco são eliminados nos 5 primeiros dias, seguindo-se uma eliminação menos acentuada ( $\approx 10$  % nos 10 dias subsequentes).

Verifica-se no experimento de longa duração que provavelmente ocorrem outros dois pontos de inflexão por volta do 17<sup>o</sup> e do 27<sup>o</sup> dia quando a eliminação se torna mais uma vez acentuada.

Pentreath (1973) estudando a espécie Pleuronectes platessa constatou a perda de cerca de 30 % do zinco em 90 dias, após 190 dias de acumulação a partir da água. Em outro experimento o mesmo autor verificou uma perda de zinco de cerca de 60 % em 140 dias após uma injeção intraperitoneal.

É importante ressaltar os trabalhos realizados por Kudo (1976) e Ferreira e col. (1982), com a mesma espécie de peixe utilizando o mercúrio 203. Estes autores obtiveram eliminação mais rápida em curto período de tempo em relação ao zinco usado nesta dissertação.

Do ponto de vista do risco potencial do zinco e de sua transferência de um nível trófico para o outro, esta espécie ocupa

posição relevante na cadeia alimentar, pois sendo de porte pequeno é facilmente ingerido por inteiro, como alimento de peixes que se encontram em níveis tróficos superiores, atingindo em última instância animais superiores e o próprio homem.

Dentro deste contexto confirma-se a importância dos resultados obtidos no presente trabalho tanto para a absorção quanto para a eliminação do zinco pela espécie Poecilia reticulata que permitem concluir que a absorção do zinco é cumulativa e a eliminação é lenta.

Quanto às espécies comestíveis citadas no presente trabalho, verifica-se que a parte comestível (conhecida como filé) geralmente não apresenta concentrações de zinco tão elevadas como, por exemplo, as vísceras.

Desde que haja cuidados especiais na seleção das partes comestíveis, pode-se minimizar a incorporação do zinco presente no peixe proporcionando desta forma à população uma fonte alternativa importante de proteína em sua dieta alimentar.

Pode-se concluir que os objetivos propostos no presente trabalho foram plenamente alcançados. Tanto a técnica de traçadores radioativos utilizada quanto a escolha da espécie foram adequadas e permitiram estudar satisfatoriamente a absorção e a eliminação do zinco.

Os resultados obtidos são importantes se considerarmos os poucos dados encontrados na literatura sobre a bioacumulação do zinco pela fauna ictica brasileira e podem servir como subsídios para se avaliar o risco potencial e real da incorporação deste metal pela população brasileira.

TABELA 4.9 - Eliminação do zinco-65 após 30 dias de acumulação da água para peixes da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo<sup>(\*)</sup>.

Cada ponto representa a média de 24 determinações.

Tempo (dias)	Atividade no peixe (cpm/mg)	% de atividade inicial retida
1	70,51	100
2	65,19	92,4
3	64,40	91,3
4	64,79	91,8
5	61,66	87,4
6	58,34	82,7
7	56,83	80,6
9	54,75	77,6
12	54,05	76,5
13	53,81	76,3
15	53,33	75,6
16	52,07	73,0
17	50,38	71,4
18	47,22	66,9
19	45,47	64,4
22	45,00	63,9
24	44,55	63,3
26	40,86	57,9
27	35,15	49,8
28	28,48	40,3
29	26,86	38,0
30	22,46	31,0

(\*) 30 dias de eliminação.

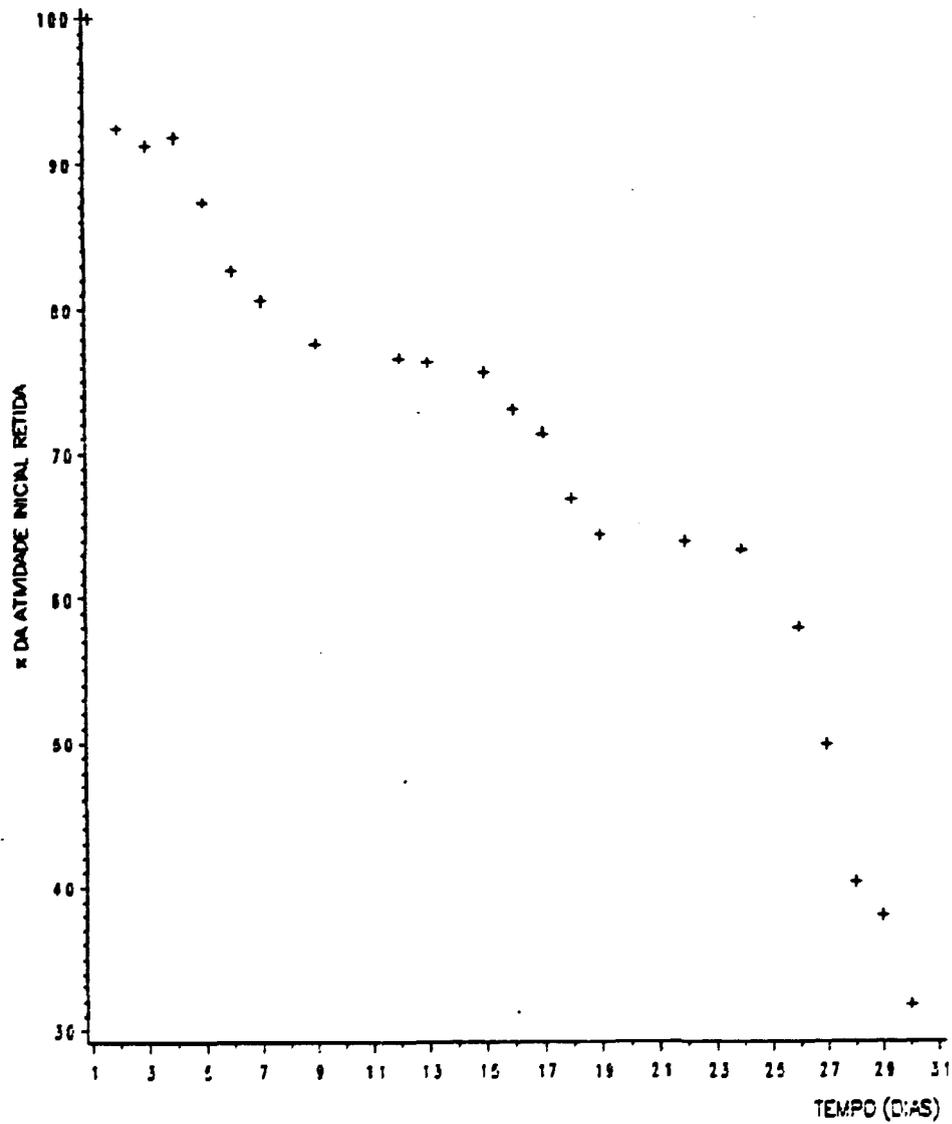


FIGURA 4.9: Eliminação do zinco-65 para peixes da espécie *Poecilia reticulata* em função do tempo, após 30 dias de acumulação da água.

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos mostraram que a técnica dos traçadores radioativos utilizada na avaliação da absorção e eliminação do zinco pela espécie Poecilia reticulata é bastante adequada.

Os estudos realizados permitiram que se chegasse às seguintes conclusões:

- Nos experimentos de curta duração verificou-se que não ocorrem diferenças substanciais na absorção do zinco quando se trabalha com machos e fêmeas separadamente, sendo que a mais alta taxa de absorção deste elemento foi observada por volta de 70 horas de exposição.

- Nos experimentos de eliminação verificou-se que os organismos liberaram o zinco lentamente sendo necessárias 120 horas para a eliminação de apenas 15% do elemento previamente absorvido.

- Nos experimentos de média duração verificou-se que ocorre uma absorção acentuada do zinco pelos peixes nos 11 primeiros dias de exposição. A partir do 11<sup>o</sup>. dia até o final do experimento (18<sup>o</sup>. dia) pode-se perceber uma tendência à estabilidade.

- Nos experimentos de eliminação de média duração confirmou-se os resultados obtidos nos experimentos de curta duração, isto é, aproximadamente 15% do zinco é eliminado nos 5 primeiros dias. Após este intervalo de tempo até o final do experimento (15<sup>o</sup>. dia) verificou-se uma eliminação de 30% do zinco inicialmente absorvido.

- Nos experimentos de longa duração confirmou-se a tendência da espécie em absorver o zinco nos 13 primeiros dias de exposição. Entretanto, a partir deste período até o final do teste (30<sup>o</sup>. dia)

comportamento de absorção bastante aleatório e incompatível com os desvios padrão correspondentes.

- Para os experimentos de eliminação do zinco constatou-se uma perda de 70% do zinco previamente absorvido, durante o intervalo de tempo considerado (30 dias). Os resultados obtidos indicam que a absorção e eliminação do zinco pela espécie Poecilia reticulata é lenta e cumulativa sendo necessários 30 dias para uma eliminação de cerca de 70% do zinco previamente absorvido.

Os resultados obtidos para a espécie Poecilia reticulata são relevantes, se considerarmos que os dados encontrados na literatura sobre a bioacumulação do zinco pela fauna ictica brasileira são escassos. Além do mais como essa espécie ocupa posição relevante na cadeia alimentar os resultados obtidos podem servir como subsídios no estudo do risco potencial da bioacumulação deste elemento na fauna piscícola em níveis tróficos superiores e em última instância no homem que é o elo final na cadeia alimentar.

Tendo em vista a relevância dos resultados obtidos no presente trabalho no estudo de bioacumulação do zinco por uma espécie bastante freqüente na fauna ictica brasileira pretende-se dar continuidade com ênfase nas seguintes linhas de pesquisa:

.. estudo da influência da temperatura, pH, oxigênio dissolvido e da dureza da água na bioacumulação do zinco.

- estudo da bioacumulação do zinco em outras espécies nativas que juntamente com a espécie estudada representam os vários níveis tróficos da cadeia alimentar.

6 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 ABEL, P.D. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J. Fish. Biol.*, 6:279-98, 1974.
- 2 ALLIABADI, M.M. & SHARP, R.E. Passage of selected heavy metals from SPHAEROTILU (BACTERIA:CHLAMYDO BACTERIALES) to PARAMECIUM CAUDATUM (PROTOZOA:CILIATA). *Water Res.*, 19(6):697-9, 1985.
- 3 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for examination of water and wastewater. 15.ed. New York, APHA, 1980.
- 4 AUSTIN, A.; DENISEGER, J.; CLARK, M.J.R., Lake Algal populations and physico-chemical changes after 14 years input of metallic mining wastes. *Water Res.*, 19(3): 299-308, 1985.
- 5 BACHMANN, R.W. & ODUM, E.P. Uptake of <sup>65</sup>Zn and primary productivity in marine benthic algae. *Limnol. Oceanogr.*, 5:349-55, 1960.
- 6 BAUDIN, J.P. Étude de la rétention du <sup>65</sup>Zn absorbé par voie tropique chez *Cyprinus carpio* L. Influence du rythme d'ingestion et de la teneur en radiozinc de la nourriture. *Water Res.*, 21(3):285-94, 1987.
- 7 BAUDIN, J.P. Étude expérimentale de la contamination d'un sédiment et d'une Annelide Polychète (*Nereis diversicolor*) muller, par le zinc <sup>65</sup>. *Radioprotection*, 16(3):175-83, 1981.
- 8 BAUDIN, J.P. Étude expérimentale de la fixation et l'élimination du zinc <sup>65</sup> par *Mytilus galloprovincialis* (L).

- 9 BENOIT, D.A. & HALCOMBE, G.W. Toxic effects of zinc on fathead minnows *Pimephales promelas* in soft water. *J. Fish Biol.*, 13:701-8, 1978.
- 10 BERG, A. Use of  $^{85}\text{Sr}$  for the determination of the contribution of direct and intestinal absorption of Ca and Sr in a freshwater fish. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Environmental contamination by radioactive materials...held in Vienna, 1969. Vienna, 1970. p. 325-38. (Proceedings series).
- 11 BERG, A.R. & WEISS, G.M. Le transfert du zinc  $^{65}$  de sediments a des larves de chiromomides et a un poisson d'eau douce et l'effet du cadmium sur ce transfert. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Impacts of nuclear releases into aquatic environment: proceedings of the... held in Otanemi, 30 June-4 July, 1975. Vienna, 1975. p. 121-32.
- 12 BILLARD, R. & ROUBAND, P. The effects of metals and cyanide on fertilization in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Water Res.*, 19(2):209-14, 1985.
- 13 BODANSKY, M. Biochemical studies on marine organisms. II. The occurrence of zinc. *J. Biol. Chem.*, 44:399-407, 1920.
- 14 BOLDRINI, C.V. & PEREIRA, D.N. Metais pesados na Baia de Santos e Estuários de Santos de São Vicente (bioacumulação). *Ambiente. Rev. CETESB Tecnol.*, 1(3):118-27, 1987.
- 15 BOWDEN, O. APUD PRATER, B.L. & ANDERSON, M.A. A 96 hour bioassay of Otter Creek, Ohio. *J. Water Pollut. Control Fed.*,

49:2099-106. 1977.

- 16 BRANCO, S.M. Observações sobre o comportamento de peixes em presença de certos compostos metálicos dissolvidos em gua. Rev. DAE, 21(37):38-41, 1960.
- 17 BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Saúde. Decreto 55-871 de 26 de março de 1965. Brasília, 1977.
- 18 BRASIL. Leis, decretos, etc. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Legislação básica. Brasília, 1977.
- 19 BRASIL. Leis, decretos, etc. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Poluição por metais pesados: seminário sobre... realizado em Brasília, 1980.
- 20 BROWN, B. & AHSANULLAH, M. Effect of heavy metals on mortality and growth. Mar. Pollut. Bull., 2(12):182-87, 1971.
- 21 BRYAN, G.W. The absorption of zinc and others metals by the brown seaweed *Laminaria digitata*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 49:225-43, 1969.
- 22 BRYAN, G.W. & HUMMERSTONE, L.G. Brown seaweed as an indicator of heavy metals in estuaries in South-West England. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 53:705-20, 1973.
- 23 BURTON, D.T.; MORGAN, E.L.; CAIRNS JR., J. Mortality curves of bluegills (*Leponis macrochirus*. Rafinesque) simultaneously exposed to temperature and zinc stress. Trans. Amer. Fish. Soc., 101(3): 435-41, 1973.
- 24 CANTERFORD, G.S.; BUCHANEN, A.S.; DUDKER, S.C. Accumulation of

- heavy metals by the marine diatom *Ditylum Bright-Wellii* (West) Grunow. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 29(5):613-22, 1978.
- 25 CASTRO, N.; BAUCH, T.; HAWAI, I.; HESPANHOL, I. O problemas das espumas formadas no Rio Tietê e na Represa Billings em São Paulo: presença de ABS, íons metálicos e microorganismos. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Engenharia sanitária e ambiental: 10. congresso brasileiro de... realizado em Manaus, 21-26 janeiro, 1979. São Paulo, 1979.
- 26 CHAPMAN, H.D. Diagnostic criteria for plants and soils. In: FEDERAL WATER POLLUTION CONTROL ADMINISTRATION. Water quality criteria. Washington, 1968. p. - .
- 27 CHIPMAN, A.; RICE, T.R.; PRICE, T.J. Uptake and accumulation of radioactive zinc by marine plancton, fish and shellfish. *U.S. Fish. Wild. Serv. Fish. Bull.*, 58(135):279-92, 1985.
- 28 CLENDENNING, K.A. & NORTH, W.J. Effects of wastes on the Giant Kelp, *Microcystis pyrifera*. In: FEDERAL WATER POLLUTION CONTROL ADMINISTRATION. Water quality criteria. Washington, 1968. p. - .
- 29 COHEN, B.L. Bioaccumulation factor in marine organisms. *Health Phys.*, 49(6):1290-4, 1985.
- 30 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Determinações biológicas. São Paulo, 1978. (Normalização técnica de Saneamento Ambiental, NT.08, 1978).
- 31 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Contaminação

- por metais pesados nos peixes da Represa de Barra Bonita. São Paulo, DAEE, 1984. (Relatório CETESB-DAEE).
- 32 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Estudos dos manguesais. São Paulo, 1983. (Projeto Baixada Santista. O.S. 204-161).
- 33 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Metais pesados no Estuário e Baía de Santos. São Paulo, 1980. (Relatório CETESB).
- 34 COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB/Sema, 1984.
- 35 CRANDALL, C.A. & GOODNIGHT, C.J. Effects of sublethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy, *Lebistes reticulatus*. *Limnol. Oceanogr.*, 7(15):233-39, 1962.
- 36 CROSS, F.A.; HARDY, L.H.; JONES, N.Y.; BARBER, R.T. Relation between total body weight and concentrations of manganese, iron, copper, zinc and mercury in the white muscle of blue fish (*Pomatomus saltatrix*) and a bathydemersal fish (*Antimora rostrata*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 30:1287-91, 1973.
- 37 DAHLGAARD, H. Loss of  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{56}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{65}\text{Zn}$  e  $^{134}\text{Cs}$  by the mussel *Mytilus edulis*. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Impacts of radionuclide releases in the marine environment. Vienna, 1981.
- 38 DOUDOROFF, P.; ANDERSON, B.G.; BURDICK, G.E.; GALTOSOFF, P.S.; HART, W.P.; PATRICK, R.; STRONG, E.R.; SURBER, F.W.; VAN

- HORN, W.M. Bioassay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. *Savage Ind. Wastes*, 23(11):1380-97, 1951.
- 39 EDINGTON, J.M. & EDINGTON, M.A. Ecology and environmental planning. Londres, Chapman & Hall, 1977.
- 40 EDWARDS, R.R.C. Estimation of the respiratory rate of young plaice (*Pleuro nectar platessa*) in natural conditions using <sup>65</sup>Zn. *Nature*, 216: 1335-7, 1967.
- 41 ELTON, J.; PEKKARINEN, M.; KRISTOFFERSSON, R. Effects of low concentrations of heavy metals on the bivalve *Macoma Balthica*. *Ann. Zool., Ecol. Anim.*, 17:233-42, 1980.
- 42 ELDRIDGE, M.B.; ECHEVERRIA, T.; KORN, S. Fate of <sup>14</sup>C-benzene in eggs and larvae of Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*). *J. Fish Res. Board Can.*, 35:861-5, 1978.
- 43 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Quality criteria for water. Washington, 1976. 301p.
- 44 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Water quality criteria. Washington, 1972. 394p.
- 45 FELLEBERG, G. Introdução aos problemas da poluição ambiental. São Paulo, EDUSP, 1980.
- 46 FERREIRA, J.R.; RODRIGUES, N.S.; SGRILLO, R.B. Uptake and cleaning of mercury (<sup>203</sup>Hg (No3)2) in the guppy (*Lebistes Reticulatus*). In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Agrochemicals: fate in food and the environment using isotope techniques: proceedings of an international symposium of...held

in Rome, 7-11 June, 1982. Vienna, 1982. p. 268-71.

- 47 GARCIA AGUDO, E.; SANTOS, J.L.; MERIGHI, A.J.; SANCHEZ, W.  
Determinação das características hidráulicas da Represa Billings  
utilizando traçadores radioativos. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA  
DE ENGENHARIA SANITARIA. Engenharia sanitária: 8.<sup>o</sup> Congresso  
brasileiro de...realizado no Rio de Janeiro, 14-19 dezembro,  
1975. São Paulo, 1975. p.1-19.
- 48 GIANOTTI, P.E. Contaminação das águas pelo zinco: estudos de  
alguns aspectos relacionados com a sua toxicidade a peixes.  
São Paulo, 1985. (Dissertação apresentada à Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo).
- 49 GREENBERG, R. Impact of industrial activity on water quality.  
In: HAMMOUD, K.; MACINKO, G.; FAIRCHILD, W.B., eds. Sourcebook  
on the environment. Chicago, 1978. p.208.
- 50 GUTKNECHT, J. <sup>65</sup>Zn uptake by benthic marine algae. Limnol.  
Oceanogr., 8(1):31-8, 1965.
- 51 GUTKNECHT, J. Mechanism of radioactive zinc uptake by Ulva  
Lactuca. Limnol. Oceanogr., 6:428-31, 1961.
- 52 HARRISON, F.L. Accumulation and loss of cobalt and caesium by  
the marine clam, Mya arenaria, under laboratory and field  
conditions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY.  
Radioactive contamination of the marine environments:  
proceedings of the symposium in...held in Seattle, 1972.  
Vienna, 1973. p. 453-77.
- 53 HILTNER, R.S. & WICHMAN, H.J. Zinc in oysters. J. Biol.

Chem., 38:205-21, 1919.

- 54 HODSON, P.V. Zinc uptake by Atlantic Salmon (*Salmo salar*) exposed to a lethal concentration of zinc at 3 C, 11 C and 19 C. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32(12)2552-6, 1975.
- 55 HOSS, D.E. Accumulation of <sup>65</sup>Zn by flounder of the Genus *Paralichthys*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 93:364-8, 1964.
- 56 HUGHES, G.M. & TORT, L. Cardio-respiratory responses of rainbow trout during recovery from zinc treatment. *Environ. Pollut.*, 37A:255-66, 1985.
- 57 INSTITUTE OF TECHNOLOGY. STUDY OF CRITICAL ENVIRONMENT PROBLEMS. Man's impact on the global environment, assessment and recommendation for action. Massachusetts, 1974.
- 58 INTERNATIONAL DECADE OF OCEAN EXPLORATION. Baseline studies of pollutants in the marine environment and research recommendations. In: BASELINE conference. 1972. p.1-19.
- 59 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Water quality: determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan, Teleostei, Cyprinidae). Pt. 1. Static method. Washington, D.C., 1982. (ISO/DIS 7348/1).
- 60 JAAKKOLA, T.; TAKARASHI, H.; SOININEN, R.; RISSANEN, K.; MIETTINEN, J.K. Cadmium content of sea water: bottom, sediment and fish and its elimination rate in fish. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiotracer studies of chemical residues in food and agriculture: proceedings of...held in Vienna, 25-29

October, 1971. Vienna, 1972.

- 81 JEFFERIES, D.F. & HEWETT, C.J. The accumulation and excretion of radioactive caesium by the Plaice (*Pleuronectes platessa*) and the Thornback Ray (*Raja clavata*). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 51:411-22, 1971.
- 82 JENSEN, S. & JERNELOV, A. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, 22(3):753-4, 1969.
- 83 KIKUCHI, O.K. & MASTRO, N.L. del Incorporação e eliminação de céσιο-134 pelo caramujo *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). Publicação IPEN 160 - Julho/1968 - CNEN/SP.
- 84 KNAUSS, H.J. & PORTER, J.W. The absorption of inorganic ions by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.*, 29:229-34, 1954.
- 85 KRAUSE, M.V. & MAHAN, L.K. Food nutrition and diettherapy: a textbook of nutritional care. 7.ed. New York, W.B. Saunders, 1984.
- 86 KUDO, A. Mercury transfer from bed sediments to freshwater fish (Guppies). *J. Environ. Qual.*, 5(4):427-30, 1976.
- 87 LEBEDEVA, G.D. & KUZNETSOVA, G. Absorption of radioactive zinc by freshwater fish (an experimental investigation). *Gig. Sanit.*, 34:151-153, 1969.
- 88 LEE, C.M. Bioaccumulation tests. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Aquatic toxicity seminar, realizado em São Paulo, 15-19 setembro, 1980. São Paulo, 1980.
- 89 LIMA, O.S. Utilização de planárias de água doce como indicadores biológicos de qualidade das águas. *Rev. DAE*,

45(141):164-5, 1985.

- 70 LLOYD, R. The toxicity of zinc sulphate to rainbow trout. Ann. Appl. Biol., 48(1):84-94, 1960.
- 71 LOWMAN, F.G. Marine biological investigations at the Eniwetok test site. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY COMMISSION. Disposal of radioactive wastes: proceedings of the conference...held in Monaco, 16-21 November, 1959. Vienna, 1960. p.106-38.
- 72 LOWMAN, F.G. The occurrence and distribution of radioactive non-fission products in plants and animals of the Pacific Proving Ground. Washington, Atomic Energy Commission, 1957. (AEC report UWFL 51-61)
- 73 MALAGRINO, W. & ROCHA, A.A. Estudo comparativo da ação tóxica de um detergente biodegradável sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivipara* (Pisces: Poeciliidae). Rev. DAE, 47(148):86-91, 1987.
- 74 MALAGRINO, W.; DAMATO, M.; MUCCI, J.L.N.; ROCHA, A.A. Estudos preliminares da ação tóxica de efluentes da indústria petroquímica sobre *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE LIMNOLOGIA. Limnologia: congresso brasileiro de... realizado em Belo Horizonte, 3-5 de setembro, 1986. São Paulo, 1986, p.1-11.
- 75 MALAGRINO, W.; MUCCI, J.L.N.; DAMATO, M.; ROCHA, A.A. Estudos comparativos da ação tóxica de efluentes da indústria petroquímica sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivipara* (Pisces: Poeciliidae). In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE

- LIMNOLOGIA. Limnologia: congresso brasileiro de... realizado em Belo Horizonte, 3-5 de setembro, 1986. São Paulo, 1986. p.1-8.
- 76 MALAGRINO, W.; PEREIRA, N.; ROCHA, A.A. Avaliação dos níveis tóxicos de alguns surfactantes a moluscos da região de Ubatuba. Ambiente, Rev. CETESB Tecnol., 1(2): 99-101, 1987.
- 77 MALAGRINO, W.; PEREIRA, N.; ROCHA, A.A. Estudos preliminares da ação tóxica de um detergente biodegradável sobre *Poecilia vivipara*. Eng. Sanit., 25(3): 358-60, 1986.
- 78 MALAGRINO, W.; PEREIRA, N.; ROCHA, A.A. Estudos preliminares sobre os efeitos de baixas concentrações de detergentes aniônicos na formação do bisso em *Brachidontes solisianus*. Ambiente, Rev. CETESB Tecnol., 1(1): 37-9, 1987.
- 79 MALAGRINO, W.; ROCHA, A.A.; PEREIRA, N. Efeitos de baixas concentrações de detergentes aniônicos sobre o hábito de escavação de *Tivela mactroides* (Born, 1778), Bivalvia, Veneridae. Rev. DAE, 45(142): 313-5, 1985.
- 80 MARCHETTI, R. Critical review of the effects synthetic detergents on aquatic life: general fisheries (Council) of the mediterranean. Stud. & Rev., 26, p.1-32, 1985.
- 81 MATTHIESSEN, P. & BRAFIELD, A.E. Uptake and loss of dissolved zinc by the Stickleback (*Gasterosteus Aculeatus* L.). J. Fish. Biol., 10: 399-410, 1977.
- 82 MISHINA, J. & ODUM, E.P. Excretion rate of <sup>65</sup>Zn by *Littorina irrorationa* in relation to temperature and body size. Limnol. &

- Oceanogr., 8(1): 39-44, 1965.
- 83 MORGAN, F. The uptake of radioactivity by fish and shell fish: I-134 caesium by whole animals. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 44: 259-71, 1964.
- 84 MYTTENAERE, C.; MERLINI, M.; BITTEL, R.; DABIN, P.; MOUSNY, J.M.; POZZI, G. Étude de l'influence du cadmium stable sur le transfert du zinc-65 en écosystème irrigué par submersion (rizière irrigué). In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Impacts of nuclear releases into the aquatic environment: proceedings of a symposium on the... held in Otaniemi, 30 June - 4 July, 1975. Vienna, 1975. (IAEA-SM-198/8).
- 85 NAKATAMI, R.E. Biological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ingesting <sup>65</sup>Zn. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Disposal wastes in the seas, oceans and surface waters. Vienna, 1966. p.809-23.
- 86 NEELY, W.B. Estimating rate constants for the uptake and clearance of chemicals by fish. Environ. Sci. & Technol., 13(12): 1506-10, 1979.
- 87 NOMURA, H. Ictiologia e piscicultura. São Paulo, Nobel, 1976.
- 88 ODUM, E.P. Excretion rate of radioisotopes as indices of metabolic rates in nature: biological half-life of <sup>65</sup>Zn in relation to temperature, food consumption, growth and reproduction in arthropods. Biol. Bull., 121(1): 371-2, 1961.
- 89 OECD - Organization for economic Co-operation and Development. Guidelines for testing of Chemicals. "Fish, Acute Toxicity Test", p.11, 1981.

- 90 OHIO RIVER VALLEY WATER SANITATION COMMISSION. ORSANCO - 24  
hour - bioassay. Cincinnati, 1974. (Chemical manual).
- 91 OKADA, I. & MOTOHASHI, K. On green oysters. I. On the copper  
contents. II. Determination of copper by polarography. III.  
Relationship between copper content of sea water and that of  
oysters. J. Fish., 33:1-8, 1938.
- 92 PENTHREATH, R.J. Some further studies on the accumulation and  
retention of <sup>65</sup>Zn and <sup>54</sup>Mn by the plaice, *Pleuronectes*  
*platessa* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 21: 179-89, 1978.
- 93 PENTHREATH, R.J. The accumulation and retention of <sup>65</sup>Zn and  
<sup>54</sup>Mn by the plaice, *Pleuronectes platessa* L. J. Exp. Mar.  
Biol. Ecol., 12: 1-18, 1973.
- 94 PEREIRA, D.N.; GOLDSTEIN, E.G.; MARTINS, M.T. Bioensaios:  
perspectivas de sua utilização na avaliação da qualidade das  
águas e no controle da poluição. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA  
DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Engenharia sanitária e ambiental: 10.  
congresso brasileiro de...realizado em Manaus, 21-26 de  
janeiro, 1979. São Paulo, p.10, 1979.
- 95 PEREIRA, N.; MALAGRINO, W.; AKL JR., E. Avaliação dos níveis  
tóxicos de alguns surfactantes a moluscos das regiões de Santos  
& Ubatuba (S.P.). In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE MALACOLOGIA.  
Malacologia: 7.<sup>o</sup> encontro brasileiro de...realizado no Rio de  
Janeiro, 1-4 de julho de 1981, Rio de Janeiro, p.10, 1981.
- 96 PEREIRA, N.; MALAGRINO, W.; TOMMASI, L.R. Potencial de  
biodegradação de detergentes aniônicos das águas do Estuário de

- São Vicente. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. 33.<sup>a</sup> Reunião anual, realizada em Salvador, 08 a 15 de Julho de 1981, Bahia. São Paulo, 1981
- 97 PHILLIPS, D.J.H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments: review. Environ. Pollut., 13: 291-317, 1977.
- 98 PORTO ALEGRE. DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ESGOTOS. Inventário e classificação da ictiofauna do Rio Guaíba: pesquisa de metais e substâncias tóxicas. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Engenharia sanitária e ambiental: 12. Congresso brasileiro de...realizado em Camboriu, 20-25 novembro, 1983. São Paulo, 1983. (Trabalho n. 41).
- 99 REED, J.R. Uptake and excretion of <sup>60</sup>Co by Black Bullheads Ictalurus melas (Rafinesque). Health Phys., 21:835-844, 1971.
- 100 RICE, T.R. The accumulation and exchange of strontium by marine planktonic algae. Limnol. Oceanogr., 1: 123-37, 1956.
- 101 ROCHA, A.A. Efeitos dos poluentes encontrados nos efluentes de uma galvanoplastia. Rev. DAE, 42(130): 89-93, 1982.
- 102 ROCHA, A.A. & PEREIRA, D.N. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings, São Paulo (Brasil). Rev. Saúde Pública de São Paulo, 19: 401-10, 1985.
- 103 ROSEN, D.E. & BAILEY, R.M. The poeciliid fishes (Cyprino doutiformes) their structure, zoogeography and systematics. Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 126(1): 1-176, 1963.
- 104 ROSENTHAL, H.L. Uptake and turnover of calcium <sup>45</sup> by the

- Guppy. *Science*, 124:371-4, 1958.
- 105 SAFFIOTTI, W. Fundamentos de química, v.1: química geral, inorgânica e físico-química. São Paulo, Ed. Nacional, 1968. p. 549-51.
- 106 SALIBA, L. & KRAYZ, R. Effects of heavy metals on hatching of Brine Shrimp Eggs. *Mar. Pollut. Bull.*, 7(10): 181-2, 1976.
- 107 SALISBURY, F.B. & ROSS, C. Mineral nutrition of plants. *Plant. Physiol.*, 10: 191-210, 1969.
- 108 SANCHEZ, W.; GARCIA AGUDO, E.; SANTOS, J.L.; MERICHI, A.J. Técnicas radioisotópicas aplicadas a estudos de controle da poluição do meio ambiente. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA. *Engenharia sanitária: 8.º congresso brasileiro de...realizado no Rio de Janeiro, 14-19 de Dezembro, 1975. São Paulo, 1975.*
- 109 SEWEL, H.G. Administração e controle da qualidade ambiental. São Paulo, CETESB, 1978.
- 110 SHIMIZU, M. Procedures for radioecological studies with molluscs. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Design of radiotracer experiments in marine biological systems. Vienna, 1975. p.121-36. (Technical report series, 167)*
- 111 SHULMAN, J.; BRISBIN, I.L.; KNOX, W. Effect of temperature, salinity, and food intake on the excretion of <sup>65</sup>Zn in small marine fish. *Biol. Bull.*, 121(10): 378, 1961.
- 112 SILVA, C.C.A.; TOMMASI, L.R.; GAGLIANONE, S.; KRUSHNA, S.A.; PEREIRA, D.N.; BOLDRINI, C.V.; RESENDE, E.K.; JURAS, A.A.;

- PÁDUA, H.B. Metais pesados na Baía de Santos e Estuários de Santos e São Vicente. São Paulo, SEMA/CETESB, 1981.
- 113 SIMPSON, R.D. Uptake and loss of zinc and lead by mussels (*Mytilus edulis*) and relationships with body weight and reproductive cycle. *Mar. Pollut. Bull.*, 10(3): 74-8, 1979.
- 114 SKIDMORE, J.F. Resistance to zinc sulphate of zebrafish (*Brachydanio rerio* - Hamilton-Buchanan) at different phases of its live history. *Ann. Appl. Biol.*, 58: 47-53, 1965.
- 115 SKIDMORE, J.F. & TOVELL, P.W.A. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Res.*, 6: 217-30, 1972.
- 116 SLATER, J.V. Comparative accumulation of radioactive zinc in young rainbow, cutthroat and brook trout. *COPEIA*, 27: 158-61, 1961.
- 117 SOUZA, M.E. Influência simultânea de elevadas concentrações de metais pesados e cianetos na digestão anaeróbica de lodos e esgotos. *Rev. DAE*, 44(138):221-33, 1984.
- 118 SPEHAR, R.L.; LEONARD, E.N.; DEFOL, D.L. Chronic effects of cadmium and zinc mixtures on flagfish (*Jordanella floridae*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107(2): 354-60, 1978.
- 119 SPIES, R.B. Uptake of technetium from seawater by red abalone *Haliotis rufescens*. *Health Phys.*, 29:695-99, 1975.
- 120 SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 3: 793-821, 1969.

- 121 SPRAGUE, J.B. The ABC's of pollutant bioassay using fish. Philadelphia, ASTM, 1973. (Scientific technical publication, 528).
- 123 STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER - 14<sup>th</sup> ed. Washington. APHA-AWWA-WPCF, 615-743, 1976.
- 123 STEPHEN, L.W. & BELI, H.L. The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. J. Water Pollut. Control, 41(2): 260-5, 1969.
- 124 TAYLOR, M.C. & DEMAYO, A. Zinc. In: Guidelines for surface water quality inorganic chemical substances. Ottawa, Environment Canada, 1(1):1-52, 1980.
- 125 TOMMASI, L.R. A degradação do meio ambiente. São Paulo, Nobel, 1976.
- 126 TOWNSLEY, S.J.; REID, D.F.; EGO, W.T. Uptake of radioisotopes and their transfer through food chains by marine organisms: annual report 1959-60. Oak Ridge, TN, Department of Energy, 1960. (TID-6630).
- 127 VINOGRADOV, A.D. The elementary chemical composition of marine organisms. Mem. Seas Found. Mar. Res. New Haven, 1953. 647p. apud BOLDRINI, C.V. & PEREIRA, D.N. Metais pesados na Baía de Santos e Estuários de Santos e São Vicente (Bioacumulação). Ambiente, Rev. CETESB Tecnol., 1(3): 118-27, 1987.
- 128 WALDICHUK, M. Some biological concerns in heavy metal pollution. In: VERNBERG, F.J. & VERNBERG, W.B., eds. Pollution and physiology of marine organisms. New York, Academic Press, p.492, 1974.