

TOXICIDADE DO SULFATO DE ZINCO PARA GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*): TOXICIDADE AGUDA, CRÔNICA E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Adriana Sacioto MARCANTONIO ¹; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA²; Fernanda Menezes FRANÇA ³; Danielle Carla DIAS ⁴; Patrícia Coelho TEIXEIRA ⁵; Cláudia Maris FERREIRA ²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do sulfato de zinco (ZnSO_4) sobre os parâmetros hematológicos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, por meio de testes de toxicidade aguda e crônica. Embora a toxicidade de zinco para várias espécies de peixes já tenha sido estudada, a toxicidade deste metal não é bem conhecida para todos os organismos aquáticos, principalmente para os anfíbios. A ação desse íon metálico sobre o sistema respiratório dos peixes ocorre pela precipitação da secreção da mucosa produzida pelas brânquias dos peixes, que morrem por asfixia. Os testes de toxicidade aguda mostraram que a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ (concentração letal média) do sulfato de zinco foi $2,78 \text{ mg L}^{-1}$, nível inferior ao estabelecido pelo CONAMA. Os testes de toxicidade crônica foram realizados em três concentrações: $\text{CL}_{50-96\text{h}}/100$ ($0,0278 \text{ mg ZnSO}_4 \text{ L}^{-1}$), $\text{CL}_{50-96\text{h}}/10$ ($0,278 \text{ mg ZnSO}_4 \text{ L}^{-1}$) e $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ($2,78 \text{ mg ZnSO}_4 \text{ L}^{-1}$), durante 312 horas em sistema semi-estático, além de um grupo controle (sem adição de sulfato de zinco). As análises dos parâmetros hematológicos evidenciaram a ocorrência de alterações, indicando a possibilidade de ocorrerem efeitos crônicos em girinos de *L. catesbeianus*, que devem ser melhor estudados.

Palavras chave: Hematologia; ecotoxicologia; CL_{50}

TOXICITY OF ZINC SULPHATE FOR TADPOLES OF BULLFROG (*Lithobates catesbeianus*): ACUTE TOXICITY, CHRONIC TOXICITY AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of zinc sulfate (ZnSO_4) on hematological parameters of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* through acute toxicity tests and chronic. Although the toxicity of zinc for several species of fish have been studied, the toxicity of this metal is not well known to all aquatic organisms, especially for amphibians. The action of this metal ion on the respiratory system of fish occurs by precipitation of the secretion of mucus produced by the gills of fish that die from asphyxiation. The acute toxicity tests showed that $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ (median lethal concentration) of zinc sulfate was 2.78 mg L^{-1} level below that set by CONAMA. Chronic toxicity tests were performed on three concentrations: $\text{CL}_{50-96\text{h}}/100$ ($0.0278 \text{ mg L ZnSO}_4^{-1}$), $\text{CL}_{50-96\text{h}}/10$ ($0.278 \text{ mg L ZnSO}_4^{-1}$) and $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ($2.78 \text{ mg ZnSO}_4 \text{ L}^{-1}$) during 312 hours under semi-static, and a control group (without addition of zinc sulfate). Analyses of hematological parameters indicate the occurrence of changes, indicating the possibility of occurrence of chronic effects in tadpoles of *L. catesbeianus*, which should be better studied.

Key words: Hematology; ecotoxicology; LC_{50}

Artigo Científico: Recebido em 13/10/2010 – Aprovado em 18/05/2011

¹ Pólo APTA Vale do Paraíba – Pindamonhangaba – APTA Regional/SAA. Av. Prof. Manoel César Ribeiro, 320 - Pindamonhangaba - SP – Brasil. e-mail: adrisaci@apta.sp.gov.br (Autor Correspondente)

² Instituto de Pesca- APTA/SAA

³ Doutoranda em Biotecnologia – FAENQUIL/USP - Lorena

⁴ Pós-doutoranda Instituto de Pesca – SAA – APTA

⁵ Doutoranda em Aquicultura – CAUNESP - Jaboicabal

INTRODUÇÃO

O ecossistema aquático é considerado o meio mais suscetível à poluição. A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas, e pode ocorrer de forma intencional ou acidental, a partir de fontes naturais ou em decorrência da atividade humana (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Entretanto, os metais pesados podem também estar presentes nos sistemas aquáticos, como resultado de processos naturais, como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas, que podem causar efeitos preocupantes nos organismos aquáticos, tornando-se necessária a compreensão detalhada dos efeitos destes diferentes tipos de efluentes nos corpos d'água receptores, em busca do conhecimento essencial para o controle da poluição (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Os metais pesados estão entre as principais classes de contaminantes que são frequentemente encontrados nestes ecossistemas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; NIGRO *et al.*, 2006; MUNTEANU e MUNTEANU, 2007).

Alguns metais pesados, como cobre, ferro, zinco e cobalto, são considerados elementos essenciais aos processos biológicos, sendo absorvidos diretamente através da água ou indiretamente, através da cadeia alimentar (KARAN *et al.*, 1998; MCGEER *et al.*, 2000). Porém, em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos, especialmente aos peixes e a outros organismos aquáticos (ROMANI *et al.*, 2003; CELIK e OEHLenschlager, 2004), uma vez que pode ocorrer biomagnificação, que é o processo de acumulação progressiva de um elemento ou composto inorgânico ou orgânico ao longo da cadeia alimentar (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Ensaios de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados a diferentes concentrações de substâncias químicas, compostos químicos, efluentes ou água, por um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). A utilização de ensaios de caráter

ecotoxicológico, que venham a dar informações quanto ao efeito tóxico causado em ecossistemas por substâncias químicas nele presentes, torna-se cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental (RAYA-RODRIGUEZ, 2000). Deste modo, a realização de ensaios de toxicidade tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição (CETESB, 1990).

Os anfíbios são utilizados como bioindicadores de poluição ambiental por exercerem importante papel nos ecossistemas aquáticos, por terem seu ciclo de vida na água, quando girinos, e na água e na terra, após sofrerem metamorfose (SCHUYTEMA *et al.*, 1991; BURGER e SNODGRASS, 2001).

Uma das formas do sulfato de zinco ($ZnSO_4$) contaminar os corpos d'água é através dos efluentes industriais, podendo causar prejuízos ao ecossistema, já que a toxicidade deste metal não é bem conhecida para todos os organismos aquáticos, principalmente para os anfíbios.

O objetivo deste trabalho foi determinar, em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, o efeito do sulfato de zinco ($ZnSO_4$), por meio de testes de toxicidade aguda, e as alterações hematológicas em animais expostos a diferentes concentrações sub-letais de zinco, em testes de toxicidade crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados com girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de uma mesma desova, do Ranário Experimental do Setor de Aquicultura do Pólo Regional do Vale do Paraíba - APTA/SAA, Pindamonhangaba, SP. No início do teste, os girinos foram pesados em balança digital e medidos com régua, apresentando peso e comprimento médio de $3,31 \pm 0,08$ g e $5,58 \pm 0,08$ cm, respectivamente. O período de aclimação foi de 96 horas. Diariamente, promovia-se a renovação de 50% do volume de água do reservatório, a fim de manter sua qualidade física e química em condições aceitáveis para sobrevivência destes animais (FERREIRA *et al.*, 2003). A alimentação dos girinos durante este período consistiu de ração farelada, com 42% de

proteína bruta, na quantidade de 2% da biomassa do tanque por dia (LIMA e AGOSTINHO, 1989). Os restos de alimentos e fezes foram removidos diariamente, por sifonagem, e o volume de água sifonado foi repostado em seguida. A alimentação foi interrompida 24 horas antes do início dos testes.

O produto testado foi o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), que é um fungicida inorgânico pertencente à classe toxicológica III (ANDREI, 1993), que apresenta 92,35% de pureza e 21% de zinco. Foram realizados testes preliminares, para determinação das concentrações a serem usadas nos testes definitivos de toxicidade aguda. Para o experimento, cerca de 500 girinos foram estocados, na densidade de um exemplar para cada litro de água, em reservatórios de 250 L, dotados de sistema de aeração e instalados em sala climatizada, com controle de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12:12). Utilizou-se água de abastecimento urbano, declorada por pernoite, submetida a teste de resíduo antes da utilização. Os recipientes-teste, utilizados nos experimentos definitivos, foram aquários de vidro, revestidos internamente com sacos plásticos para evitar adsorção dos metais à parede dos aquários e possível contaminação dos mesmos.

Inicialmente foram realizados testes preliminares para determinar as doses que seriam utilizadas no teste definitivo para determinação da CL_{50} . Tanto os testes preliminares como o definitivo tiveram duração de 96 horas, em sistema estático (ASTM, 1980). O teste definitivo foi realizado utilizando-se 5 tratamentos (concentrações: 0 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} , 3 mg L^{-1} e 4 mg L^{-1}) e 4 réplicas, com 6 animais por réplica, totalizando 120 animais, respeitando-se a densidade máxima de um girino por litro, de acordo com as recomendações da APHA (1998). Os aquários foram dotados de aeração individual e cobertos por filme plástico transparente, para evitar perdas de água por evaporação e consequente elevação da concentração do metal na água (LOMBARDI *et al.*, 1999). Durante o período de exposição, os animais foram mantidos sem alimentação. A avaliação da mortalidade foi diária e os indivíduos mortos foram retirados dos recipientes, sempre no mesmo horário. Os

parâmetros físicos e químicos da água (temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) foram determinados diariamente durante a realização dos testes.

Com a determinação da CL_{50} através dos testes de toxicidade aguda, realizaram-se os testes de toxicidade crônica. Os girinos foram divididos em quatro tratamentos, sendo 0 mg L^{-1} (controle); $0,0278 \text{ mg L}^{-1}$ ($\text{CL}_{50}/100$); $0,278 \text{ mg L}^{-1}$ ($\text{CL}_{50}/10$) e $2,78 \text{ mg L}^{-1}$ (CL_{50}), com 3 réplicas, e transferidos para aquários sem a presença dos elementos (grupo controle = 0 mg L^{-1}) e nas concentrações correspondentes à $\text{CL}_{50}/100$, $\text{CL}_{50}/10$ e CL_{50} conforme metodologia descrita por BASSOI *et al.* (1990). Os testes foram efetuados em sistema semi-estático, com duração de 312 horas e renovação das soluções a cada 96 horas. A densidade inicial utilizada foi de 1 girino L^{-1} , com um total de 12 girinos por aquário, com capacidade de 18 L cada. Diariamente, os parâmetros físicos e químicos da água foram aferidos (pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura). A cada 24 horas, os girinos mortos foram retirados.

Amostras de sangue ($10 \mu\text{L}$) de dois girinos de cada aquário foram coletadas no início dos testes, antes da contaminação (momento zero), no 7º e no 14º dias, via punção do vaso caudal, com auxílio de micropipeta com ponteiros heparinizados, e utilizadas para as determinações do hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); da taxa de hemoglobina (Hb), efetuada pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944); contagem de eritrócitos (Er) ou número total de células, realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente; cálculo dos índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo WINTROBE (1934); contagem total e diferencial de leucócitos e total de trombócitos em extensões sanguíneas. Para a contagem diferencial de leucócitos (CDL), as extensões foram coradas pelo método de ROSENFELD (1947), mascaradas, codificadas e examinadas sob microscopia de luz comum, com objetiva de imersão (100X). Foram contados 200 glóbulos

brancos por lâmina. As células foram classificadas em cinco categorias: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, conforme sua morfologia e visualização ao microscópio, tomando-se por base os critérios adotados por DIAS (1992) e TURNER (1988). Todas as lâminas analisadas para a CDL foram utilizadas para a contagem total de leucócitos, de trombócitos e de células vermelhas imaturas. Foram contadas 2.000 células vermelhas por lâmina, classificando-as segundo metodologia proposta por HRUBE e SMITH (1998).

Para o cálculo da $CL_{50(96h)}$ utilizou-se o método estatístico "Trimed Spearman-Kärber" (HAMILTON *et al.*, 1977). Nos testes de toxicidade crônica, a análise estatística foi efetuada por meio do programa SAS, comparando-se os resultados obtidos para os animais do grupo-controle e para os animais expostos. Na comparação entre as coletas de sangue realizadas no momento zero, aos 7 dias e aos 14 dias, em concentrações sub-letais em relação ao grupo controle, utilizou-se o teste de variância ANOVA com dois fatores, analisando as possíveis influências dos efeitos da concentração dos metais e do tempo de exposição sobre os parâmetros hematológicos. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste de Tuckey (ZAR, 1996), para comparação de médias. Todos os testes foram realizados considerando nível de significância de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos parâmetros físicos e químicos da água, os valores observados foram: temperatura = $25,0 \pm 0,5$ °C, pH = $7,5 \pm 0,3$, condutividade elétrica = 130 ± 5 $\mu S\ cm^{-1}$, oxigênio dissolvido = $7,5 \pm 0,2$ mg L^{-1} .

Para os girinos de rã-touro, a CL_{50} - 96 horas foi de 2,78 mg de zinco L^{-1} . A partir do valor de CL_{50} obtido no teste de toxicidade aguda, realizou-se o teste de toxicidade crônica do zinco com girinos de *Lithobates catesbeianus*.

Na Figura 1 estão representados os valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos, e na Figura 2 estão representados os valores de VCM, HCM e CHCM de girinos de rã-touro expostos ao sulfato de zinco. Os valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos não diferiram estatisticamente entre as coletas ($p \leq 0,05$). O mesmo ocorreu com os valores de VCM, HCM e CHCM. Entretanto, notou-se redução nos valores médios da taxa de hemoglobina no tratamento T2 ($CL_{50}/10$) aos 14 dias, o que também foi observado em relação aos valores de eritrócitos no tratamento T1 ($CL_{50}/100$), aos 7 dias. Já os valores de VCM e de HCM, no tratamento T1 ($CL_{50}/100$) aos 7 dias, mostraram-se superiores aos demais.

O zinco tem papel principal na estabilidade de membranas biológicas por competição com metais redox ativos como o cobre e ferro podendo interferir, desta maneira, na síntese de hemoglobina. Um dos mais importantes efeitos subletais do Zn^{2+} em peixes é a inibição da absorção de cálcio (Ca^{2+}), já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias, podendo levar a hipocalcemia, o que pode prejudicar a integridade da membrana celular e a estabilização da permeabilidade branquial (HERSKOWITZ e HELGUERO, 1998), podendo levar os animais à morte (HEIJERICK *et al.*, 2002). Em girinos, este fato ainda não está bem elucidado, não se conhecendo como se dá a absorção de cálcio nestes animais. Além disso, os dados obtidos no presente estudo indicam que o zinco não prejudicou a síntese de hemoglobina.

Na Figura 3 estão representados os valores médios do número de células vermelhas imaturas e dos trombócitos. Os valores médios de células imaturas mostraram-se inferiores no tratamento T1 ($CL_{50}/100$) aos 7 dias e superiores, no mesmo tratamento, aos 14 dias, quando comparados com os demais tratamentos, flutuação que não afetou a normalidade do hemograma. O mesmo comportamento foi observado com os valores médios de trombócitos.

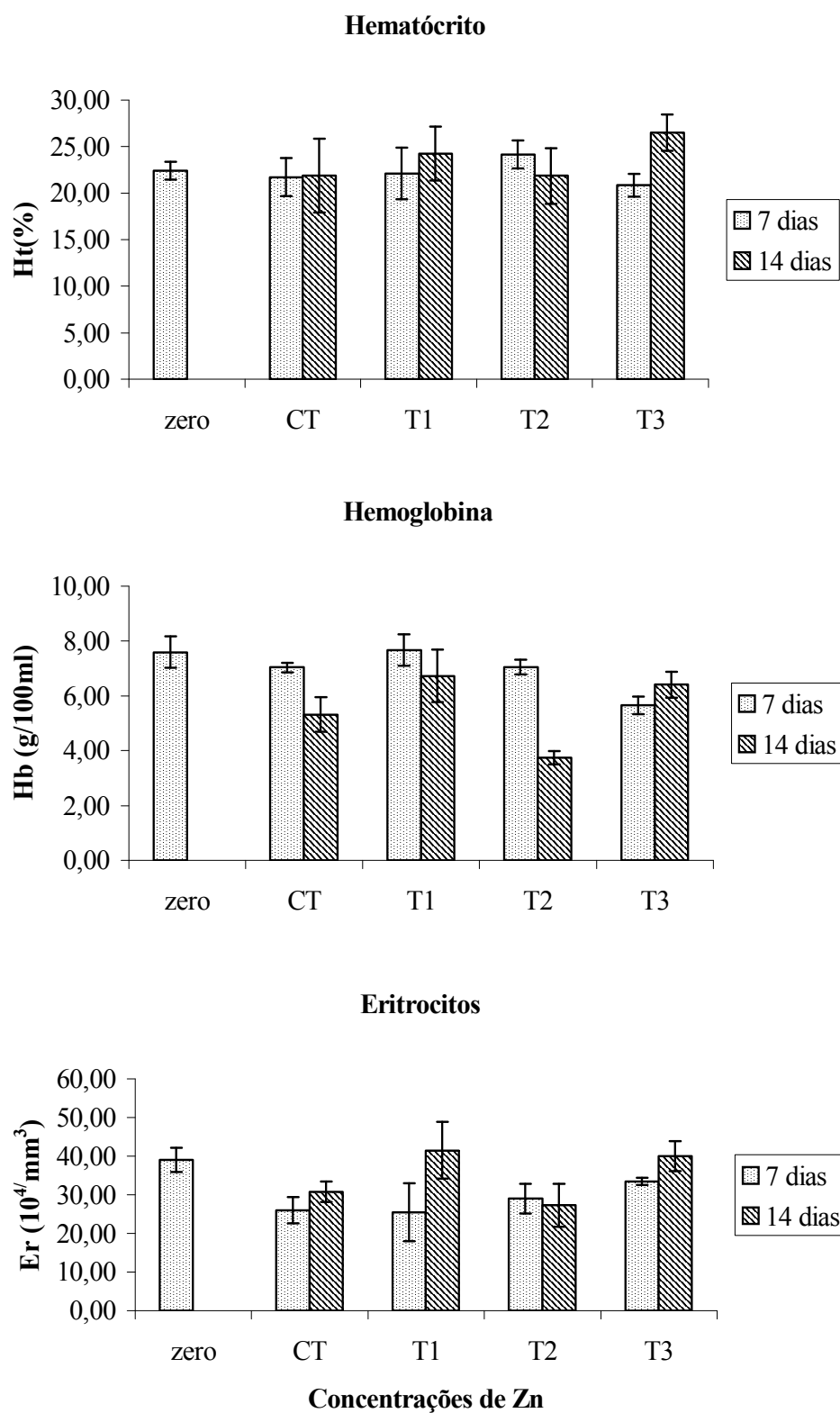


Figura 1. Valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos a diferentes concentrações de zinco. zero = momento zero (início do experimento); CT = tratamento controle; T1 = CL50/100; T2 = CL50/10; T3 = CL50

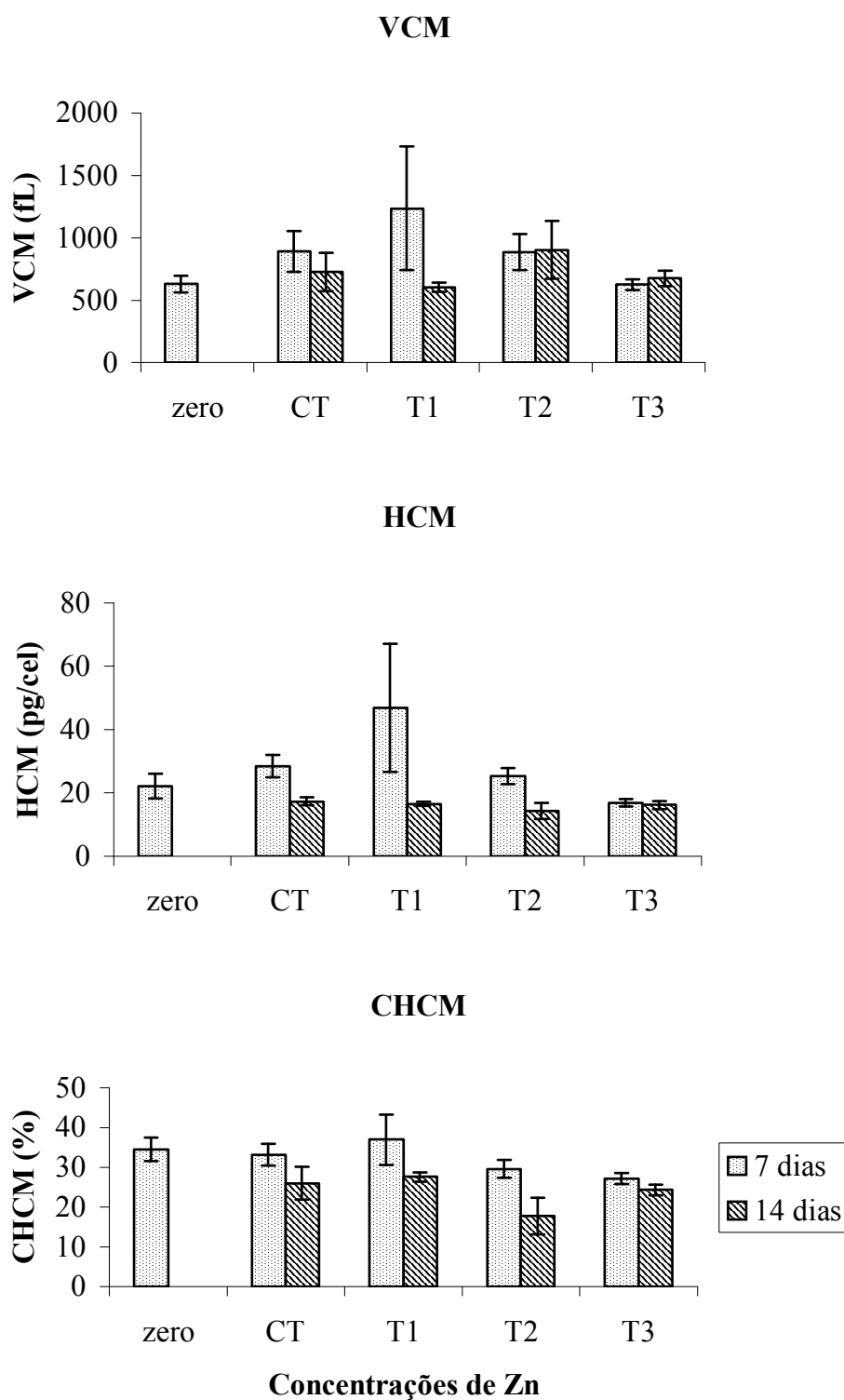


Figura 2. Valores médios de VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos a diferentes concentrações de zinco. zero = momento zero (início do experimento); CT = tratamento controle; T1 = $CL_{50}/100$; T2 = $CL_{50}/10$; T3 = CL_{50}

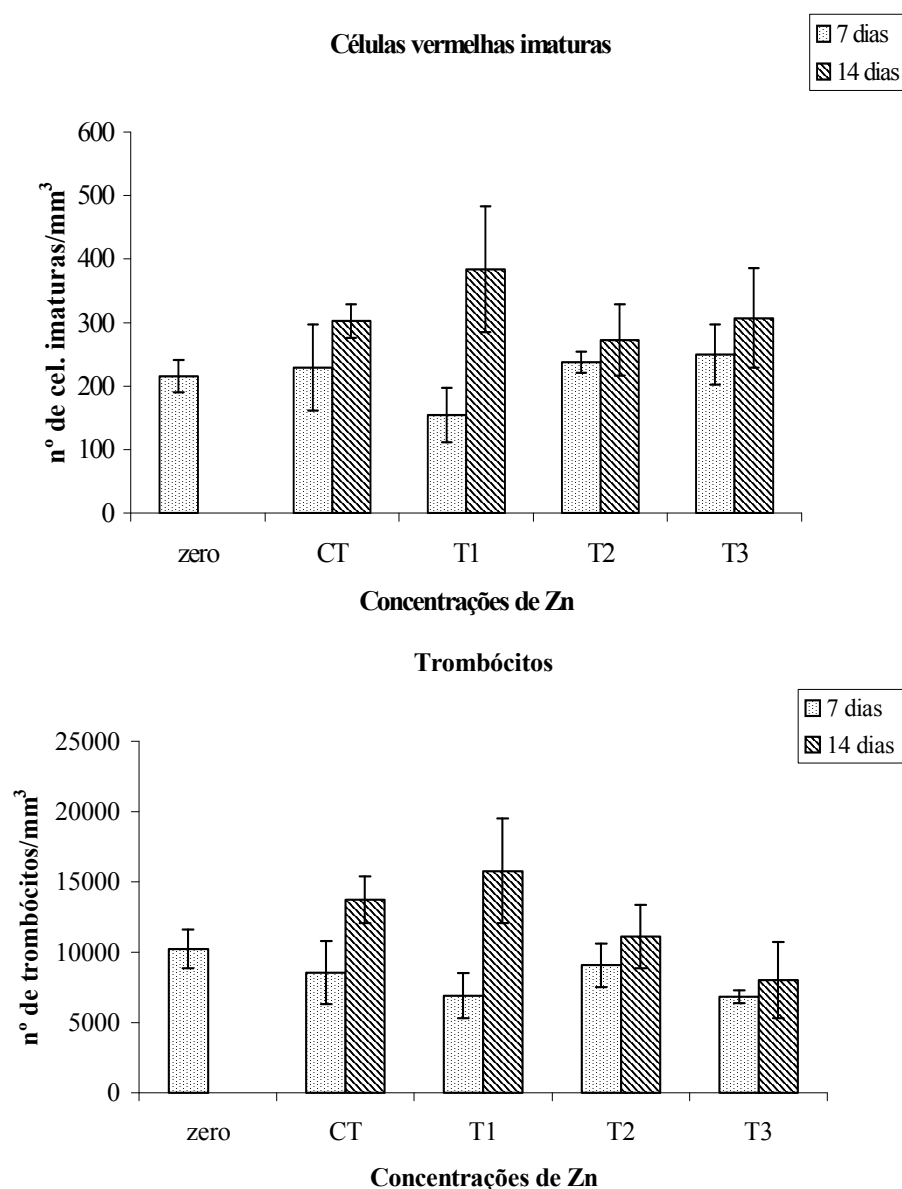


Figura 3. Valores médios do número de células vermelhas imaturas e de trombócitos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos a diferentes concentrações de zinco. zero = momento zero (início do experimento); CT = tratamento controle; T1 = CL₅₀/100; T2 = CL₅₀/10; T3 = CL₅₀

Nota-se, pelas Figuras 4 e 5, que ocorreu leucopenia leve com linfocitose, no tratamento T1 (CL₅₀/100) aos 14 dias, causada, principalmente, por neutropenia. Ocorreu neutrofilia nos tratamentos T2 (CL₅₀/10) e T3 (CL₅₀), aos 14 dias, e monocitose no tratamento T3 (CL₅₀), aos 7 dias, indício de aumento da produção das células de

defesa do organismo. Processo semelhante em mamíferos foi descrito por JANNINI e JANNINI FILHO (1995). Ocorreu basopenia nos tratamentos T2 (CL₅₀/10) e T3 (CL₅₀), aos 14 dias, e eosinopenia no tratamento T2 (CL₅₀/10) aos 7 e aos 14 dias, o que pode indicar uma possível reação alérgica destes animais ao zinco.

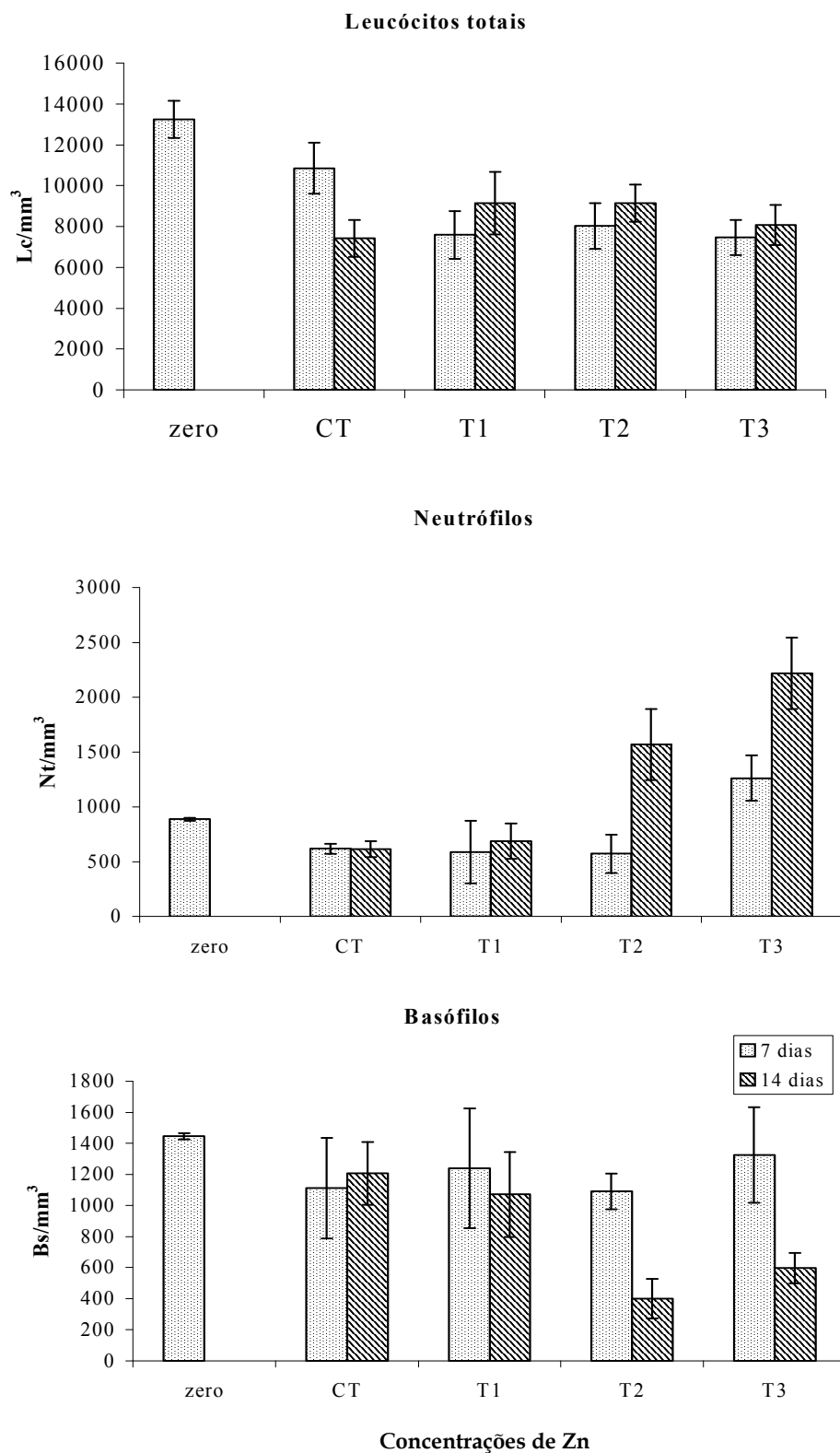


Figura 4. Valores médios do número de leucócitos totais, neutrófilos e basófilos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos a diferentes concentrações de zinco. zero = momento zero (início do experimento); CT = tratamento controle; T1 = CL₅₀/100; T2 = CL₅₀/10; T3 = CL₅₀

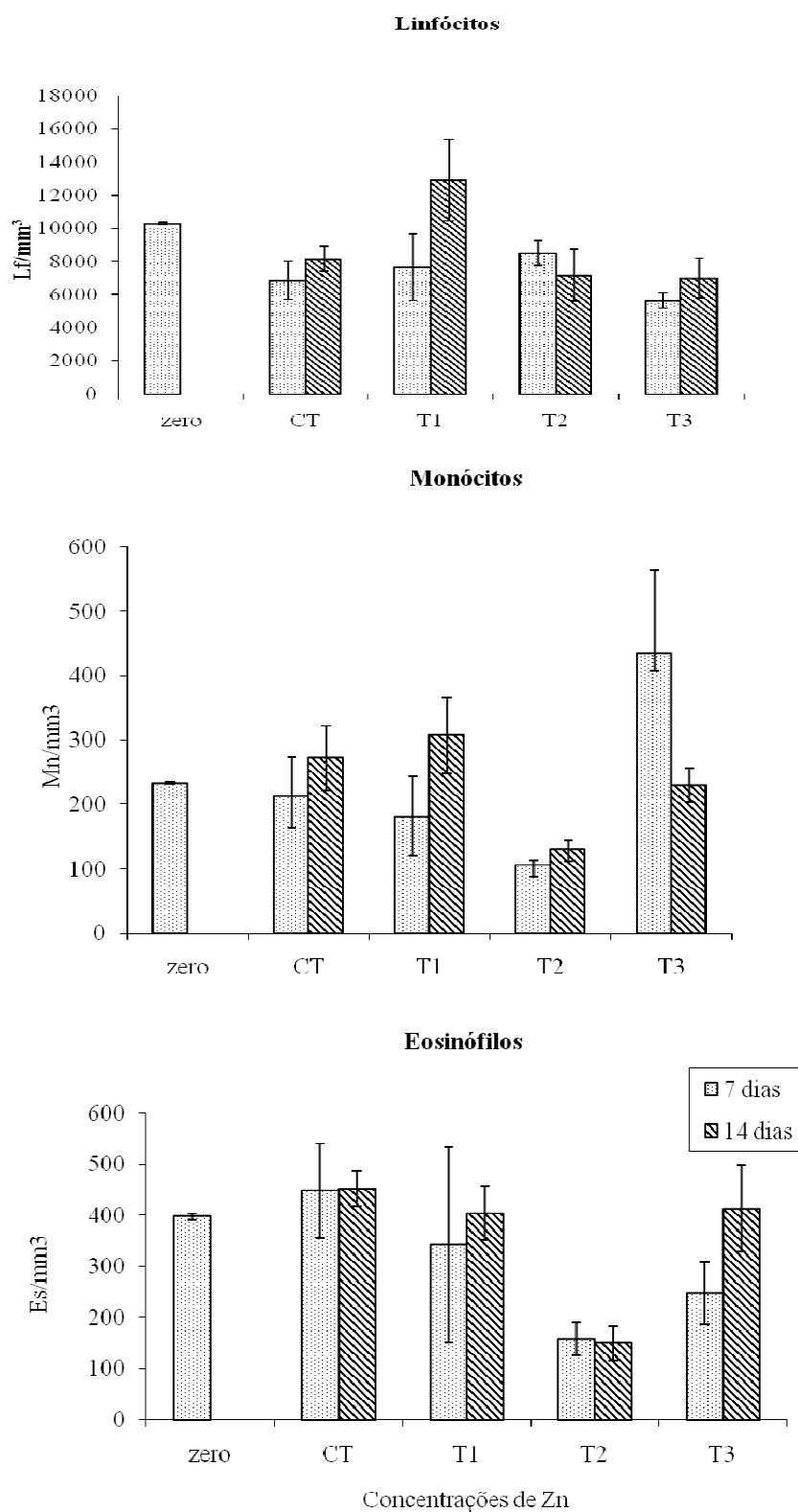


Figura 5. Valores médios do número de linfócitos, monócitos e eosinófilos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos a diferentes concentrações de zinco. zero = momento zero (início experimento); CT = tratamento controle; T1 = $CL_{50}/100$; T2 = $CL_{50}/10$; T3 = CL_{50}

O zinco é um elemento essencial no crescimento de todos os tecidos, sendo um cofator do DNA e RNA polimerase, e parece ter uma ação modulatória e protetora no crescimento celular (HERSKOVITS e HELGUERO, 1998). Além disso, foi demonstrado que exerce papel imunestimulador, atuando na atividade dos glóbulos brancos produtores de anticorpos e de outras células fagocitárias, e que o seu déficit induz numerosas alterações no sistema imunológico.

A Resolução CONAMA nº 357, de 17/03/2005, estabelece o valor máximo de 5 mg L⁻¹ de Zn²⁺ para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, embora a CL50 96h estimada para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) esteja abaixo do valor máximo estabelecido pelo CONAMA, há evidências da necessidade de realização de estudos complementares, uma vez que podem provocar efeitos agudos ou crônicos em girinos desta espécie. De acordo com SANTOS (2009), a CL50 96h estimada para lambaris (*Astyanax bimaculatus*) foi 10 mg L⁻¹ de Zn na água, enquanto GÜL *et al.* (2009), obtiveram o valor da CL50 96h de 30,826 mg L⁻¹ para *Poecilia reticulata*, valores estes superiores ao limite estipulado pelo CONAMA (2005). Em lambaris (*A. bimaculatus*), embora essa concentração possa não provocar mortalidade, observou-se comprometimento das funções fisiológicas do fígado, havendo a necessidade de revisão desta legislação brasileira. Ainda, conforme SANTOS (2009), o zinco mostrou-se altamente tóxico em exposição aguda, mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira, sendo observadas alterações histopatológicas nos lambaris, encontrando-se congestão vascular, diminuição do volume celular, deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose, desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário e vacuolização.

O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais como o zinco, pode causar diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos (BORDAJANDI *et al.*, 2003; SIRAJ BASHA e USHA RANI, 2003; DAUTREMEPUTS *et al.*, 2004), o que pode expressar as condições ambientais e representar o tempo de exposição

aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ *et al.*, 2002).

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a necessidade de estudos complementares sobre possíveis efeitos crônicos em girinos de rã-touro, uma vez que concentrações subletais de zinco, bem como de outros produtos tóxicos no ambiente aquático, podem não resultar em mortalidade imediata dos animais, mas a exposição de organismos a baixas concentrações de um determinado produto, por um longo período de tempo, pode resultar em um efeito semelhante, quando há exposição a concentrações elevadas por um curto período de tempo (HELLAWELL, 1988), revelando alterações nas funções do sistema endócrino, do sistema reprodutivo, distúrbios na síntese de cortisol e na indução da síntese da vitelogenina (LEBLOND e HONTELA, 1999; FOSSI *et al.*, 2004).

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1998 *Standard methods for the examination of water and wastewater*, AWWA, 20th. 1368p.
- ANDREI, E. 1993 *Compêndio de defensivos agrícolas*. Andrei Editora Ltda, São Paulo-SP. 448p.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS 1980 *Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians*. Philadelphia. 780p.
- BASSOI, L.J.; NIETO, R.; TREMAROLI, D. 1990 *Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo, CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 7p.
- BORDAJANDI, L.R.; GÓMEZ, G.; FERNÁNDEZ, M.A.; ABAD, E.; RIVERA, J.; GONZÁLEZ, M.J. 2003 Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere*, Amsterdam, 53: 163-171.
- BURGER, J. e SNODGRASS, J. 2001 Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah River Site: location and body compartment effects. *Environmental Research*, Baltimore, 86(2): 157-166.

- CELIK, U. e OEHLENSCHLAGER, J. 2004 Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry*, Barking, 87: 343-347.
- CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1990 *Considerações preliminares sobre toxicidade aos organismos aquáticos*. São Paulo: CETESB. 11 p.
- COLLIER, H.B. 1944 *The standardizations of blood haemoglobin determinations*. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, 50: 550-552.
- CONAMA 2005 Resolução CONAMA nº357 de 17/03/2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 27 set. 2010.
- DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS, S.; BETOULLE, S.; VERNET, G. 2004 Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 137C: 325-333.
- DIAS, J.L.C. 1992 *Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (Rana catesbeiana Shaw, 1802)*. São Paulo, 117p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP).
- FERREIRA, C.M.; BUENO-GUMARÃES, H.M.; SOARES, S.R.C.; RANZANIPAIVA, M.J.T.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. 2003 Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, 16(2): 83-88.
- FOSSI, M.C.; CASINI, S.; MARSILI, L.; ANCORA, S.; MORI, G.; NERI, G.; ROMEO, T.; AUSILI, A. 2004 Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disruptors during a fouryear survey of the Mediterranean population of swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Environmental Research*, New York, 48: 425-429.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAUJO, R.P.A.; RAMOS, M.L.L.C. 1990 *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo. CETESB: Série Manuais, 6. 17p.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal Clinical Pathology*, Hagerstown, 56(1): 35-39.
- GÜL, A.; YILMAZ, M.; ISILAK, Z. 2009 Acute Toxicity of Zinc Sulphate ($ZnSO_4 \cdot H_2O$) to Guppies (*Poecilia reticulata* P., 1859). *Gazi University Journal of Science*, Ankara, 22(2): 59-65.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. 1977 Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, Easton, 7: 714-719.
- HEIJERICK, D.G.; SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSEN, C.R. 2002 Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model. *Environmental Toxicology & Chemistry*, Malden, 21(6): 1309-1315.
- HELLAWELL, J.M. 1988 Toxic substances in river and streams. *Environmental Pollution*, Barking, 50: 61-85.
- HERSKOWITZ, J. e HELGUERO, L.A. 1998 Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibians embryos. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, 221: 1-10.
- HRUBE, T.C. e SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed.). *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th ed. Blackburg: Wiley-Blackwell. p.1120-1125.
- JANNINI, P. e JANNINI FILHO, P. 1995 *Interpretação clínica do hemograma*. 10ª. ed.. São Paulo: Sarvier. 625 p.
- KARAN, V.; VITOROVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. 1998 Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, 40: 49-55.
- LEBLOND, V. S. e HONTELA, A. 1999 Effects of in vitro exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, 157: 16-22.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C.A. 1989 *A Criação de Rãs*. 2ª ed, São Paulo: Globo. 187p.

- LOMBARDI, J.V.; PERPÉTUO, T.; FERREIRA, C.M.; MARQUES, H.L.A.; MACHADO-NETO, J. 1999 Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin Archives of Environmental Contamination Toxicology*, New York, 69(3): 415-420.
- MARTINEZ, C.B.R. e CÓLUS, I.M.S. 2002 Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: Cap.29. p.551- 577.
- MCGEER, J.C.; SZEDEDINSZKY, C.; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. 2000 Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, 50: 231-243.
- MUNTEANU, V. e MUNTEANU, G. 2007 Biomonitoring of mercury pollution: A case study from the Dniester River. *Ecological Indicators*, New York, 7: 498-496.
- NIGRO, M.; FALLEN, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. 2006 Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, 77(4): 339-347.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. 2005 Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, 74(1): 53-69.
- RAYA-RODRIGUEZ, M. T. 2000 O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: ZURITA, M.L.L. e TOLFO, A.M. (org.). *A qualidade do ar em Porto Alegre*. Porto Alegre: Secretaria Municipal de Meio Ambiente, p.68-76.
- ROMANI, R.; ANTOGNELLI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. 2003 Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, Amsterdam, 145: 321-329.
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, 20: 329-334.
- SANTOS, D.C.M. 2009 Toxidez aguda do zinco em lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*). Viçosa, 125p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa).
- SCHMALZ, W.F.; HERNANDEZ, A.D.; WEIS, P. 2002 Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research*, New York, 54: 539-542.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L.; WILSON, K.N. 1991 Teratogenesis, toxicity, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin. *Bulletin Archives of Environmental Contamination Toxicology*, New York, 21: 332-350.
- SIRAJ BASHA, P. e USHA RANI, A. 2003 Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, 56: 218-221.
- TURNER, R.J. 1988 Amphibians. In: ROWLEY, A.F. e RATCLIFFE, N.N.A. *Vertebrate Blood Cells*. New York, Cambridge University Press. p.129-209.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, Leipzig, 51: 32-49.
- ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2008 *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 2ª Ed. São Carlos: Rima. 486p.
- ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. New Jersey, Prentice Hall. 662p.