

# ESTUDOS SOBRE A TOXICIDADE AGUDA DO OXICLORETO DE COBRE PARA O PEIXE *Poecilia reticulata* \*

Marcello Villar BOOCK <sup>1,3</sup> e Joaquim Gonçalves MACHADO NETO <sup>2</sup>

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a toxicidade do fungicida oxiclureto de cobre para o peixe guaru (*Poecilia reticulata*). No teste de toxicidade aguda, peixes de ambos os sexos e com peso médio de  $90 \pm 10$  mg foram expostos a concentrações crescentes do fungicida por 96 horas. A  $CL_{50}$  obtida foi 0,1 mg/L de oxiclureto de cobre, correspondendo a 0,06 mg de cobre metálico/litro. No teste de bioacumulação, os peixes foram expostos a 0,02 e 0,0006 mg/L de  $Cu^{+2}$  por 192 horas e, posteriormente, transferidos para água não contaminada, onde permaneceram por 168 horas, visando à observação da depuração desse elemento pelos animais. Neste teste observou-se que em ambas as concentrações houve acúmulo de cobre, e que o metal foi totalmente eliminado apenas pelos peixes expostos à menor concentração (0,0006 mg/L).

**Palavras-chave:** *Poecilia reticulata*; toxicidade aguda; oxiclureto de cobre; bioacumulação

## STUDIES ON THE ACUTE TOXICITY OF COPPER OXYCHLORIDE FOR THE FISH *Poecilia reticulata*

### ABSTRACT

The present study was carried out with the objective of determining the acute toxicity of the fungicide copper oxychloride for the common guppy (*Poecilia reticulata*), as well as the bioaccumulation of that substance in the fish. In the test of acute toxicity, the guppies of both sexes, with approximately  $90 \pm 10$  mg of weight, were exposed to growing concentrations of the fungicide for 96 hours. The  $LC_{50}$  calculated was 0.1 mg/L of copper oxychloride, corresponding to 0.06 mg/L of metallic copper. In the bioaccumulation test, the fishes were exposed to the concentrations of 0.02 and 0.0006 mg/L of copper for 192 hours, and after transferred to uncontaminated water, where they lasted for 168 hours, in order to observe the capacity of the fishes in depurate the metal. In the test, the copper accumulation was registered in fishes exposed to both tested concentrations, however, the metal was totally eliminated only by the fishes exposed to the smallest concentration (0.0006 mg/L).

**Key words:** *Poecilia reticulata*; acute toxicity; copper oxychloride; bioaccumulation

---

**Artigo Científico:** Recebido em: 16/08/2004 – Aprovado em: 06/04/2005

<sup>1</sup> Endereço/Address: Rua Juca Quito, 1088, Centro - CEP: 14870-000 Jaboticabal, SP, Brasil - e-mail: marcelloboock@ig.com.br

<sup>2</sup> FCAV/UNESP - Jaboticabal

\* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, financiado pela CAPES/CNPq

## INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de agrotóxicos, principalmente após a segunda guerra, tem causado impacto negativo no meio ambiente (RAND e PETROCELLI, 1985). Segundo MURTY (1988a), dentre os principais problemas ocasionados pelo uso intensivo de agrotóxicos estão o estabelecimento de populações de pragas resistentes, em decorrência do uso prolongado de um mesmo ingrediente ativo; pragas secundárias assumindo importância principal, devido à destruição de seus inimigos naturais por produtos não seletivos; efeitos adversos sobre organismos não visados; e bioconcentração.

A água constitui um dos elementos fundamentais para a sobrevivência dos organismos nos ecossistemas. Se a água estiver contaminada por agrotóxicos, pode-se considerar que todos os demais componentes bióticos e abióticos do sistema também estarão (MACHADO NETO, 1991). A contaminação do ambiente aquático por agrotóxicos pode ocorrer por diversas vias, sendo as mais comuns a aplicação direta visando ao controle de insetos e plantas aquáticas; a deriva de pulverizações; o carreamento de partículas de solo contaminado; a lixiviação; e a limpeza de embalagens e equipamentos utilizados nas aplicações do agrotóxico (BAPTISTA, 1988).

No Brasil, o fungicida oxicloreto de cobre destaca-se por sua ampla utilização no controle de antracnose, requeima, ferrugem, míldio e outras doenças de diversas culturas, dentre as quais a do algodão, da batata, café, citros, feijão e tomate (ANDREI, 1993). Além da toxicidade aguda ocasionada pela contaminação por essa substância, os organismos aquáticos podem sofrer efeitos da intoxicação crônica, quando expostos, por prolongados períodos de tempo, a concentrações subletais. Este problema é agravado pela tendência de os metais pesados, como o cobre, se acumularem no sedimento, de onde poderão ser translocados através dos diversos componentes da cadeia biológica, ocasionando sua bioconcentração (RAND e PETROCELLI, 1985). Ainda segundo RAND e PETROCELLI (1985), tais efeitos podem ser avaliados através de experimentos desenvolvidos em laboratório.

O peixe *Poecilia reticulata*, popularmente conhecido como guaru ou lebiste, foi introduzido no Brasil para o controle biológico de mosquitos, em razão de seu hábito alimentar larvófago (KOHNE, 1991). Segundo SVOBODOVA *et al.* (1983) e KUMAR *et al.* (1995), essa espécie é muito utilizada em estudos de

toxicidade, devido à sua notável capacidade de adaptação às condições de laboratório, sendo indicada, em APHA (1998), como organismo-teste.

O presente estudo teve por objetivos determinar, em laboratório, para o peixe *Poecilia reticulata*, o valor da concentração letal média (CL<sub>50</sub>-96 horas) do fungicida oxicloreto de cobre e seu equivalente em cobre metálico, a bioacumulação e a depuração do cátion cobre no peixe, e verificar se o limite máximo permitido pelo CONAMA (1986) para o cátion cobre na água apresenta riscos de bioacumulação em *P. reticulata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material e a metodologia utilizados no estudo seguiram as recomendações estabelecidas em APHA *et al.* (1998); MURTY (1988a, b); e RAND e PETROCELLI (1985).

Os experimentos foram desenvolvidos na sala de bioensaios do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Cerca de 2.000 exemplares de *Poecilia reticulata* (machos e fêmeas, de diferentes idades e tamanhos) foram coletados na represa do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) e estocados em reservatórios de fibro-amianto contendo, cada um, 1.000 litros de água proveniente de poço artesiano. A água dos reservatórios era renovada em 100% de seu volume, diariamente, por fluxo contínuo. De acordo com as recomendações contidas em APHA *et al.* (1998), foi cumprido um período mínimo de sete dias para a observação das condições de saúde dos peixes, para recuperação do estresse provido pelo transporte e para adaptação ao novo meio aquático. A alimentação consistiu de ração para peixes ornamentais, Tetramin, fornecida *ad libitum*, diariamente. A densidade utilizada foi de um animal por litro de água.

Após o período de observação, os animais foram mantidos em aclimação às condições de laboratório, por uma semana, como recomendado por MURTY (1988b). Os recipientes destinados a esse fim eram aquários de vidro com 30 ou 90 litros de capacidade, dotados de aeração promovida por bombas de ar. A temperatura da água foi mantida a 25±1 °C, em sala climatizada por condicionador de ar. O fotoperíodo foi de 12 horas claro : 12 horas escuro. Foi utilizada a água reconstituída, com dureza média de 40 ppm, pH de 7±1 e valor mínimo de 40% de saturação de oxigênio, como recomendado em IBAMA (1987).

A alimentação dos peixes durante o período de aclimação foi a mesma mencionada anteriormente. Os restos de alimento e as fezes eram removidos diariamente com auxílio de sifão, e o volume da água retirada era repostado logo a seguir. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes.

O produto utilizado nos testes foi o fungicida CUPRA 500<sup>®</sup>, de formulação pó molhável (WP), fabricado pela HOKKO do Brasil S.A., contendo 840 gramas de oxiclreto de cobre por quilograma de produto comercial, equivalentes a 500 gramas de cobre metálico.

A partir de testes preliminares, foram determinadas as concentrações utilizadas nos tratamentos do experimento definitivo, as quais corresponderam a: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 mg/L de cobre metálico. Um tratamento controle também foi aplicado, e todos os tratamentos tiveram quatro réplicas cada um.

Os recipientes utilizados eram frascos de vidro, com quatro litros de capacidade, contendo três litros de solução, conforme recomendado em APHA (1998). Cada recipiente recebeu dez animais com peso individual variando entre 80 e 100 miligramas, de maneira a não ultrapassar a densidade de 1,0 grama por litro.

As condições de água, a temperatura e o fotoperíodo de realização do experimento foram iguais ao descrito para o período de aclimação.

O período de exposição aguda dos animais à substância tóxica foi de 96 horas, sendo os mesmos mantidos sem alimentação. A avaliação da mortalidade era diária, e os indivíduos mortos eram retirados dos recipientes. O sistema de realização do teste foi o estático (sem substituição de água e nem retirada de detritos durante o período de exposição). O teor de amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) na água foi quantificado no início e no final do experimento.

Após a realização dos testes definitivos, os peixes sobreviventes foram sacrificados e fixados em álcool 70%, para posterior determinação da acumulação de cobre durante as 96 horas de exposição.

No teste de bioacumulação do cátion Cu<sup>2+</sup>, os recipientes-teste eram aquários de vidro de 40 litros de capacidade, contendo 30 litros de solução. O sistema de realização foi o estático (sem renovação de água), e o período de exposição foi de oito dias, conforme recomendado em IBAMA (1987). Após essa fase, os animais foram transferidos para outros

recipientes contendo água sem o fungicida, onde foram mantidos por sete dias, para avaliação da depuração do cobre.

Em intervalos de 48 horas, durante a execução da fase de exposição, amostras de peixe foram retiradas, para monitorar o acúmulo do cátion Cu<sup>2+</sup>. Na fase de depuração, as amostragens foram realizadas a cada 72 horas.

As concentrações de cobre utilizadas foram 0,02 mg/L (limite máximo permitido pelo CONAMA, através da Resolução nº 20, de 18/6/1986) e 1/100 do valor da CL<sub>50</sub> calculada para o *P. reticulata*, como recomendado em IBAMA, 1987. Por aquário, foram utilizados 60 animais com peso médio igual a 0,09 g, respeitando-se a densidade máxima de 1,0 grama por litro de água.

Os animais eram alimentados diariamente com ração para peixes ornamentais, da marca Tetramin<sup>®</sup>, sendo observado o consumo da ração, de maneira a evitar que restos deteriorassem, comprometendo a qualidade da água.

Nos testes de toxicidade aguda utilizou-se o método estatístico "Trimed Spearman-Kärber" (HAMILTON *et al.*, 1977) para o cálculo da CL<sub>50</sub>-96 horas. Todos os cálculos foram realizados pelo programa computacional estatístico "LC<sub>50</sub> Programs JSPear test". Para a construção dos gráficos e cálculo dos valores das regressões lineares, utilizou-se o programa computacional Microsoft Word do Office Premium 2000.

As amostras de peixe coletadas no decorrer dos testes foram secas à temperatura de 60 °C em estufa dotada de circulação de ar, sendo posteriormente trituradas. Alíquotas de 0,5 g foram então digeridas quimicamente e diluídas em 50 ml de água deionizada para leitura em espectrofotômetro de absorção atômica com chama de acetileno, da marca GBC e modelo 349.

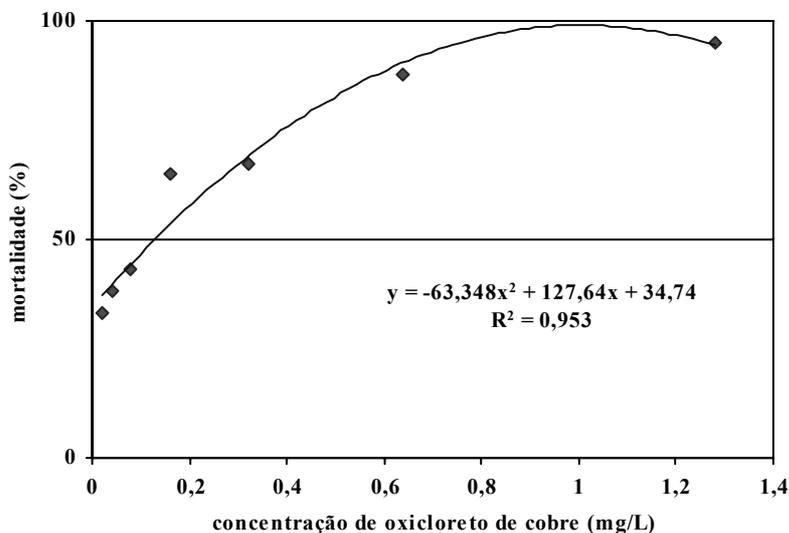
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de amônia não-ionizada (NH<sub>3</sub>), medidas ao início e ao final dos testes, situaram-se abaixo de 20 µg/L (variando de 0 a 17 µg/L), como recomendado por RAND e PETROCELLI (1985), que consideram esse valor seguro, não interferindo nos resultados dos testes de toxicidade.

Na figura 1 estão representadas as porcentagens de mortalidade de *Poecilia reticulata*, obtidas em função das concentrações de oxiclreto de cobre a que os animais foram expostos para a obtenção da

CL<sub>50</sub>-96 horas, constatando-se que no teste de toxicidade aguda a taxa de mortalidade aumentou com a elevação da concentração do fungicida na água,

e o alto valor do coeficiente de regressão linear calculado para os dados obtidos ( $R^2 = 0,953$ ) confirma essa ocorrência.



**Figura 1.** Representação gráfica da mortalidade de *Poecilia reticulata* em função da concentração de oxiclreto de cobre no teste de toxicidade aguda

A CL<sub>50</sub>-96 horas calculada para *P. reticulata*, pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977), foi de 0,10 mg de oxiclreto de cobre por litro, que corresponde a 0,06 mg de cobre metálico por litro. Este valor é cerca de 16,4 vezes menor que o obtido por KHANGAROT e RAY (1987) para esta mesma espécie: CL<sub>50</sub> = 0,986 mg/L de cobre. Essa diferença pode ser atribuída à metodologia empregada por KHANGAROT e RAY (1987), que utilizaram água “dura” (175 ppm de CaCO<sub>3</sub>) na realização do teste. Segundo SPRAGUE (1970), a solubilidade de metais na água está associada a fatores abióticos, como o pH e a dureza, que influem na toxicidade destes compostos para os peixes. GIANOTTI (1985) observou efeitos letais e subletais em espécimes de *P. reticulata* expostos ao sulfato de zinco, verificando também que a toxicidade desse metal aumentou com a diminuição da alcalinidade e da dureza.

A espécie *P. reticulata* é comumente encontrada em ambientes altamente contaminados por compostos orgânicos (efluentes urbanos). Entretanto, essa resistência apresentada pela espécie parece estar relacionada à capacidade que tem de captar oxigênio dissolvido na camada superficial da água e não à sua tolerância a metais pesados. YARZHOMBEK *et al.* (1991) estudaram os efeitos de diversas substâncias, dentre as quais o sulfato de cobre, em *P. reticulata* e

observaram CL<sub>50</sub>-24 horas igual a 87 mg/litro, valor este considerado baixo pelos autores, em relação àqueles apresentados por outros produtos, e que ressalta a alta sensibilidade da espécie ao elemento cobre. Neste contexto, pode-se citar trabalhos em que os autores determinaram valores mais elevados de CL<sub>50</sub> para outras espécies de peixe, como, por exemplo, o trabalho de OLIVEIRA-FILHO *et al.* (1997), em que, para o paulistinha (*Brachydanio rerio*), o valor da CL<sub>50</sub> do cobre foi estimado em 0,18 mg/L, valor este que corresponde ao triplo daquele obtido no presente trabalho. Altos valores também foram observados por SONSIRI (1982), que determinou, para tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), valores de CL<sub>50</sub> iguais a 73,40; 63,92 e 58,30 mg de cobre por litro, após 24, 48 e 72 horas respectivamente. Já SEDDEK (1990), também estudando *O. niloticus*, calculou CL<sub>50</sub> de 31,9 mg de sulfato de cobre.

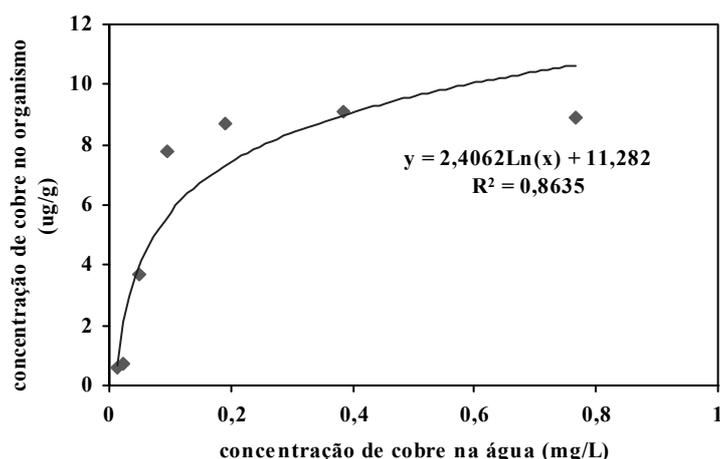
Dentre os trabalhos sobre bioacumulação em *P. reticulata*, pode-se citar o de TAS *et al.* (1996), que, estudando o acúmulo de diversos contaminantes ambientais, como o “antifouling” - tributyltin, observaram incremento do acúmulo de tributyltin nos animais, que foi diretamente proporcional ao aumento da concentração da substância no meio, resultado esse, semelhante ao obtido no presente trabalho para o elemento cobre.

No Brasil há poucos trabalhos sobre toxicidade crônica e bioacumulação do íon cobre em peixes. DEVALECHIA (1981) observou acúmulo deste metal nas brânquias de acará (*Geophagus brasiliensis*), exposto cronicamente ao cobre. MAZON (1997) constatou acúmulo do íon cobre nas brânquias, fígado, rim, intestino e estômago do curimatá (*Prochilodus scrofa*), quando exposto às concentrações de 0,025 e 0,029 mg/L durante 96 horas.

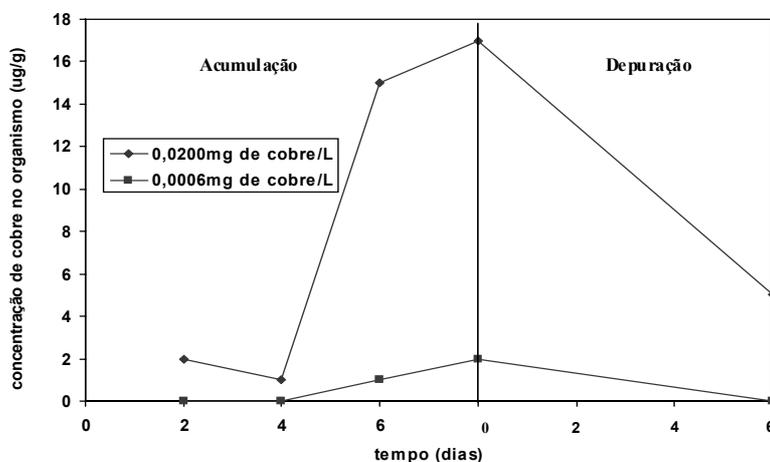
No teste de toxicidade aguda, realizado no presente estudo, observou-se que os animais expostos às doses mais altas acumularam maior quantidade de cobre que aqueles expostos a doses mais baixas (Figura 2). O mesmo ocorreu no teste de toxicidade crônica (Figura 3), no qual se verificou que o acúmulo do cátion em *P. reticulata* foi menor quando o peixe foi exposto a 0,0006 mg/L (1/100 CL<sub>50</sub>), em comparação com o valor do acúmulo quando a concentração do cátion foi 0,02 mg/litro. Essa mesma tendência foi

observada por LOMBARDI *et al.* (2002), que constataram acúmulo de cobre diretamente proporcional à concentração do metal a que girinos de *Rana catesbeiana* foram expostos. Resultados opostos a esse foram registrados por LOMBARDI *et al.* (2000) em teste de toxicidade aguda com pós-larvas do camarão *Macrobrachium rosenbergii*, pois constataram acúmulo de cobre inversamente proporcional ao aumento da concentração desse metal na água.

No presente estudo verificou-se que, na fase de depuração, os exemplares de *P. reticulata* expostos à menor concentração eliminaram totalmente o cobre, ao passo que, nos animais expostos à maior concentração, a depuração do metal não foi completa (Figura 3). Assim, o valor correspondente a 1/100 da CL<sub>50</sub> (0,0006 mg/L) pode ser considerado mais seguro que o estabelecido pelo CONAMA (1986), por apresentar menores riscos de bioacumulação.



**Figura 2.** Representação gráfica da acumulação ( $\mu\text{g/g}$ ) do cátion  $\text{Cu}^{+2}$  em *Poecilia reticulata*, em função da concentração de oxiclreto de cobre na água, no teste de toxicidade aguda



**Figura 3.** Representação gráfica da concentração do cátion  $\text{Cu}^{+2}$  em *Poecilia reticulata*, nas fases de acumulação e depuração

## CONCLUSÕES

- O peixe *Poecilia reticulata*, quando exposto em laboratório ao fungicida oxicloreto de cobre por um período de 96 horas (exposição aguda), acumula cobre no organismo;

- A espécie estudada acumula cobre quando exposta (em condições de laboratório) à concentração de 0,02 mg/L por 192 horas (exposição crônica), não o eliminando, mesmo após 168 horas de depuração, o que indica que esse valor (recomendado pelo CONAMA, 1986) não é totalmente seguro como limite máximo permitido no ambiente aquático;

- Em condições experimentais, o peixe *P. reticulata*, exposto a 0,0006 mg/L (1/100 CL<sub>50</sub>) de cobre por 192 horas, bioacumula esse íon metálico, eliminando-o totalmente do organismo ao ser transferido para água sem fungicida e aí permanecendo por 168 horas;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREI, E. 1993 *Compêndio de agrotóxicos agrícolas*. 4. ed. São Paulo: Editora. p.130-131.
- APHA - American Public Health Association; AWWA - American Water Works Association; WPCF - Water Pollution Control Federation 1998 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. Washington DC. 1085p.
- WPCF - Water Pollution Control Federation 1998 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. Washington DC. 1085p.
- BAPTISTA, G.C. 1988 *Introdução e ocorrência de defensivos agrícolas no meio ambiente*. In: CURSO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, INSETICIDAS E ACARICIDAS - MÓDULO 4., Brasília, 1988. MEC/ABEAS. 17p.
- CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente 1986 Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da União*, Brasília, Art. 4º, item - m, 30/07/1986.
- DEVALECHIA, M.L. 1981 *Tolerância a íons cuprínicos em acará, *Geophagus brasiliensis**. São Carlos. 272p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos).
- GIANOTTI, E.P. 1985 *Contaminação da água pelo zinco: estudo de alguns aspectos relacionados com a toxicidade a peixes*. São Carlos. 150p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos).
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. 1977 Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 7: 714-719.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente 1987 *Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: Avaliação da toxicidade aguda para peixes*. Brasília. 128p.
- KHANGAROT e RAY 1987 Studies on the acute toxicity of copper and mercury alone and in combination to the guppy *Poecilia reticulata* (PETERS). *Arch. Hydrobiol.*, 110(2): 303-314.
- KOHNEM, U.P. 1991 *O guppy - criação e desenvolvimento*. 2 ed. São Paulo: Nobel. p.09-26.
- KUMAR, S.; SAHAY, S.S.; SINHA, M.K. 1995 Bioassay of distillery effluent on common guppy, *Lebistes reticulatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 309-316.
- LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, J.G.; BROSSI-GARCIA, A.L.; MARQUES, H.L.A.; KUBO, E. 2000 Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65(3): 383-390.
- LOMBARDI, J.V.; PERPÉTUO, T.R.; FERREIRA, C.M.; MACHADO-NETO, J.G.; MARQUES, H.L.A. 2002 Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69: 415-420.
- MACHADO NETO, J.G. 1991 *Ecotoxicologia de agrotóxicos*. Jaboticabal: FUNEP. 49p.
- MAZON, A.F. 1997 *Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)*. São Carlos. 160p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos).
- MURTY, A.S. 1988a *Toxicity of pesticide to fish*. CRC Press. v. 1, 129p.
- MURTY, A.S. 1988b *Toxicity of pesticide to fish*. CRC Press. v. 2, 165p.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C.; LOPES, R.M.; PAUMGARTEEN, F.J.R. 1997 Avaliação da toxicidade aguda do oxicloreto de cobre para o

- peixe *Brachidanyo rerio*. *Rev. Bras. Toxicol.*, 10(2): 82. Suplemento.
- RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. 1985 *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington. 665p.
- SEDDEK, A. 1990 Acute toxicity studies of the molluscicide copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) on some Nile fish. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 23(45): 166-175.
- SOMSIRI, C. 1982 Acute toxicity of mercury, copper and zinc to Nile tilapia. *Thai. Fish. Gaz.*, 35(3): 313-318.
- SPRAGUE, J.B. 1970 Measurement of pollutant toxicity to fish II. Utilizing and applying bioassay results. *Wat. Res.*, Oxford, 4(1): 3-32.
- SVOBODOVA, Z.; HAVLIKOVA, J.; SAUER, J. 1983 Acute toxicity of chemicals on the basis of copper oxychloride to fish and aquatic invertebrates. *Pr. Vurh. Vodnany Pap. Riffh Vodnany*, 12: 16-28.
- TAS, J.W.; KEIZER, A.; OPPERHUIZEN, A. 1996 Bioaccumulation and body burden of four triorganotin compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57: 146-154.
- Yarzhombek, A.A.; Mikulin, A.Y.; Zhdanova, A.N. 1991 Toxicity of substances in relation to form of exposure. *J. Ichthyol.*, 31(7): 99-106.