



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

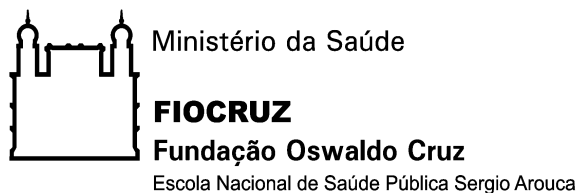
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

**AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM EM
TEMPO REAL PARA MONITORAMENTO DE EFEITO TÓXICO
NO COMPORTAMENTO NATATÓRIO DO PEIXE *Danio rerio*
(*Hamilton, 1822*)**

por

DANIELLY DE PAIVA MAGALHÃES

**Rio de Janeiro
2007**



DANIELLY DE PAIVA MAGALHÃES

AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM EM TEMPO REAL PARA MONITORAMENTO DE EFEITO TÓXICO NO COMPORTAMENTO NATATÓRIO DO PEIXE *Danio rerio* (Hamilton, 1822).

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora na Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ) como parte dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Membros da banca examinadora:

Dr. JOSINO COSTA MOREIRA

Dr. MOACÉLIO VERÂNIO SILVA E FILHO

Orientadores:

ANA ROSA LINDE ARIAS

DARCILIO FERNANDES BAPTISTA

Defendida e aprovada em 23 de março de 2007.

M188s Magalhães, Danielly de Paiva
Avaliação de um sistema de análise de imagem em tempo real para monitoramento de efeito tóxico no comportamento natatório do peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822). / Danielly de Paiva Magalhães. Rio de Janeiro: s.n., 2007.
79 p.,il., tab., graf.

Orientador: Arias, Ana Rosa Linde

Baptista, Darcílio Fernandes

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

1.Processamento de imagem assistida por computador.
2.Toxicidade. 3.Comportamento animal. 4.Paulistinha.
5.Monitoramento Ambiental. 6.Indústria Têxtil. I.Título.

CDD - 20.ed. – 597.482

*“O peixe é bastante diferente
Ninguém pode entender como é seu gênio
Reservas porções de oxigênio
Mutações para o meio ambiente
Tem mais cartilagem resistente
Habitando na orla ou profundidade
Devora outros peixes pra despesa
E tem época do acasalamento
revestido de escamas esse elemento
Com a força da santa natureza.”*

(Ivanildo Vilanova e Xangai - Natureza (trecho))

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de mestrado significa, acima de tudo, construir um caminho. Nessa caminhada passamos por momentos de angústia até encontramos a alegria extrema ao ver que concluímos mais uma etapa com garra. Muitos contribuíram neste percurso mesmo sem saber. Deixo aqui meu agradecimento a todos e, em particular,

À minha família, meus pais Rosiméri e Paulo César, e meu irmão Daniel pelo carinho, por acreditarem em mim, pela dedicação nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos meus orientadores Dra. Ana Rosa Linde Arias e Dr. Darcilio Baptista, pela confiança, por compartilharam comigo esse caminho de surpresas com tanta paciência, competência e dedicação. Muito obrigada!

Ao meu namorado Daniel, sempre presente ao meu lado torcendo e ajudando a organizar minhas idéias, pelas críticas, bem como incentivo e apoio.

Ao Rodolfo A. Cunha pela ajuda com os equipamentos e pela amizade.

À amiga e aluna Thaíssa, que me ajudou no desenvolvimento dos testes, por ter sido responsável, dedicada e companheira.

Ao Valdeci Valim pelos testes de dureza.

Ao Augusto, que me ajudou com a química e com as diluições.

Ao Aloysio, pela aprendizagem e pelas correções.

Aos amigos do LAPSA e do departamento de Biologia, onde foi realizada essa dissertação.

Ao pessoal do CESTEJ, principalmente à Rita e a Paula, que me receberam e me trataram com tanto carinho e respeito.

Aos professores do programa de mestrado da ENSP, aprendi muito com vocês, muito obrigada!

Às pessoas que me acompanharam por toda minha vida com muita torcida: tia Rosana, Raphinha, vó Natalina, bisa Ofelina, vô Manuel, vó Mercedes, vô Milton, Nanã, Quel, Bia, Felipe, Rufina, Sérgio, obrigada pelo carinho e calor familiar.

Às amigas da época da faculdade que mesmo com a distância a amizade continua, Geórgia, Deborah e Érika - as pessoas mais engraçadas e loucas que já conheci! Obrigada pela amizade, carinho e torcida.

Aos novos amigos do mestrado Carla, Ana e Marcos, obrigada pela troca de experiência e pelo convívio tão agradável nesses dois anos.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, expreso meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada pelo carinho e por toda ajuda.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. SISTEMAS DE BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL EM OPERAÇÃO NO MUNDO.....	8
1.2 PROBLEMA.....	9
1.2.1 <i>A Indústria Têxtil.....</i>	10
(A) <i>Os Impactos Ambientais do setor têxtil.....</i>	10
(B) <i>Processos e Efluentes Líquidos da Indústria Têxtil.....</i>	11
(C) <i>Características de Algumas Substâncias Auxiliares Utilizadas.....</i>	16
2. OBJETIVO GERAL.....	20
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO.....	22
4.1 ORGANISMO-TESTE.....	22
4.1.1 <i>Manutenção dos peixes em laboratório.....</i>	23
4.2 SUBSTÂNCIA-TESTE.....	24
4.3 Testes	24
Ecotoxicológicos.....	
4.3.1 <i>Teste de Toxicidade Aguda.....</i>	24
4.3.2 <i>Registro Comportamental em Tempo Real.....</i>	25
4.3.3 <i>Descrição do Sistema Analisador de Imagem em Tempo Real.....</i>	27
4.4. ANÁLISE DE DADOS.....	30
5. RESULTADOS.....	31

6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSOES.....	51
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	53
ANEXOS.....	63
ASPECTOS RELEVANTES.....	64
<i>1. QUALIDADE DA ÁGUA DO AQUÁRIO E SAÚDE DOS PEIXES.....</i>	64
<i>1.2 Amônia.....</i>	<i>64</i>
<i>1.3 Alimentação dos Peixes.....</i>	<i>66</i>
<i>2 REAGENTES</i>	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	USACEHR - biomonitor aquático para comportamento de peixe.	8
FIGURA 2	Organismo-teste: peixe <i>Danio rerio</i>	22
FIGURA 3	Aquários de manutenção.	23
FIGURA 4	Teste de toxicidade aguda em sistema estático.	25
FIGURA 5	Desenho esquemático do biomonitor.	28
FIGURA 6	(a) Foto do sistema; (b) interior da cabine de madeira; (c) interior da cabine de registro, mostrando a câmera acima; (d) boxes de contenção com os oito peixes em compartimentos individualizados.	29
FIGURA 7	Distribuição dos valores da velocidade média dos grupos controles que acompanharam cada concentração testada antes e depois da introdução de água.	34
FIGURA 8	Distribuição dos valores da velocidade média dos grupos tratados com ácido sulfúrico.	35
FIGURA 9	Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao ácido sulfúrico.	36
FIGURA 10	Distribuição dos valores da velocidade média dos grupos tratados com formaldeído.	37
FIGURA 11	Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao formaldeído	37
FIGURA 12	Resposta comportamental de cada peixe exposto à concentração de 10% da CL ₅₀ do formaldeído	38

FIGURA 13	Distribuição dos valores da velocidade média em dos grupos tratados com hidróxido de sódio.	39
FIGURA 14	Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao hidróxido de sódio.	39
FIGURA 15	(a) Aquário com filtro de placas e pedras, (b) Aquário somente com filtro de placas (c) Filtro de placa.	65
FIGURA 16	Filtro de espuma.	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Percentual de mortalidade por concentração para o teste de toxicidade aguda de 24horas com o peixe Danio rerio.	31
TABELA 2	<i>Wilcoxon Matched Pairs Test</i>	33
TABELA 3	Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao ácido sulfúrico.	40
TABELA 4	Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao formaldeído.	41
TABELA 5	Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao hidróxido de sódio	42

RESUMO

A alteração do comportamento animal pode ser interpretada como a resposta da interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais sendo, desta forma, uma ferramenta eficiente para detecção de contaminantes relacionados a efeitos tóxicos. Neste estudo foram realizados testes comportamentais utilizando a atividade natatória do peixe *Danio rerio* como bioindicador de concentrações subletais. Para isso, três substâncias auxiliares da indústria têxtil foram escolhidas: H_2SO_4 , CH_2O e $NaOH$. Para a determinação das concentrações subletais foram realizados testes de toxicidade aguda. A partir desses testes, doze peixes foram expostos a 10%, 30%, 50% e 70% da CL_{50} de cada substância para avaliação do efeito tóxico sobre o comportamento de locomoção. Com o auxílio de um sistema de análise de imagem (VIDEOMEX-V[®]), os peixes foram monitorados um período de 4 horas, sendo duas horas sem exposição e mais duas horas com a substância-teste. A velocidade média foi usada para avaliar o efeito subletal das substâncias. A concentração de 10% da CL_{50} para o CH_2O causou hiperatividade, mas não foi considerada tóxica para os peixes. As concentrações de 10 e 30% da CL_{50} para o H_2SO_4 e 10% da CL_{50} para o $NaOH$ não causaram alteração comportamental. Foram consideradas tóxicas para *D. rerio* as concentrações de 30% da CL_{50} para CH_2O , 50 e 70% da CL_{50} para H_2SO_4 e 30, 50 e 70% da CL_{50} para $NaOH$, pois causaram diminuição na velocidade de natação. Esses resultados demonstraram que *D. rerio* é um bom biosensor na detecção de concentrações subletais. O biomonitoramento em tempo real em laboratório mostrou-se um método não-invasivo e prático e poderá ser utilizado para analisar a toxicidade crônica de efluentes industriais ou substâncias químicas específicas em laboratório, pois tem sensibilidade elevada comparável com outros testes toxicológicos e gera respostas rapidamente.

Palavras-chave: *Danio rerio*; comportamento de natação; ecotoxicologia; indústria têxtil; biomonitoramento em tempo real.

ABSTRACT

Behavior alterations can be interpreted as a response of interaction between physiological process and environmental stimulus, therefore, they are efficient tools for detection of chemical related to toxic effects. In this study, behavior tests were done using the swimming activity of *Danio rerio* as a bioindicator of exposition to sublethal concentrations. For this purpose, three auxiliaries chemicals of the textile industry were chosen: sulfuric acid, formaldehyde and sodium hydroxide. Sublethal concentrations were defined by acute toxicity tests. Twelve fish were exposed to 10%, 30%, 50% e 70% of the LC₅₀ to evaluate the toxic effects in swimming activity caused by each tested chemical. An image analysis system (VIDEOMEX-V[®]) was used to monitor swimming activity. Fish were monitored for 4h: 2h without chemical exposition followed by 2h with the addition of test-concentration. The mean velocity was used to evaluate the sublethal effects. The 10% of LC₅₀ of CH₂O concentration caused hyperactivity in fish swimming behavior but it was not considered as a toxic concentration. 10% and 30% of LC₅₀ of H₂SO₄ and 10% of LC₅₀ of NaOH did not induce significantly swimming alterations. Although, 30% of LC₅₀ of CH₂O, 50% and 70% LC₅₀ of H₂SO₄ and 30%, 50% and 70% of LC₅₀ of NaOH were considered as toxic because induced a hypo activity, characterizing an adverse effect. The results showed that *D. rerio* is a good biosensor to detect sublethal concentrations. Real time biomonitoring in laboratory is a non-invasive and practical test and could be used to evaluate the chronic toxicity of industrial waste or some specific toxicant in laboratory, using the swimming behaviour of *D. rerio*. It has more sensitivity compared to others toxicological tests and produce quickly responses.

Key words: *Danio rerio*; swimming behavior; ecotoxicology; textile industry; real time biomonitoring.

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural essencial, seja como componente de seres vivos, seja como meio de vida de várias espécies vegetais e animais, como elemento representativo de valores socioculturais e como fator de produção de bens de consumo e produtos agrícolas. Por isso sua preservação é importante e envolve duas dimensões, uma referente à quantidade e outra referente à qualidade.

As fontes de poluição das águas, pelos seus mais diversos usos, podem ser de causa natural ou antropogênica, como a poluição causada por efluentes domésticos e industriais e pela drenagem de áreas agrícolas e urbanas¹. Embora dependam da água para a sobrevivência e para o desenvolvimento econômico, as sociedades humanas poluem e degradam esse recurso, tanto as águas superficiais quanto as subterrâneas.

Uma das grandes ameaças à sobrevivência da humanidade nos próximos séculos é a contaminação química das águas. O aumento da fabricação de substâncias químicas, logo após a 2ª Guerra Mundial (a chamada “revolução química”), produziu uma enorme variedade de compostos químicos e cerca de 87 mil compostos sintéticos².

Essas substâncias químicas foram desenvolvidas como intermediários industriais, para controlar as doenças, aumentar a produção de alimentos, de bens de consumo e a expectativa de vida das pessoas. Entretanto, ironicamente, tornaram-se um problema à saúde pública, à saúde humana e à biodiversidade devido ao lançamento de efluentes líquidos, tratados ou não, nos corpos d'água. Podendo provocar alterações nas características físicas, químicas e biológicas dos corpos d'água, colocando em risco os sistemas de suporte à vida, incluindo a biodiversidade do planeta. Esses efluentes podem conter elevadas concentrações de matéria orgânica, sólidos em suspensão, metais e compostos tóxicos, microorganismos patogênicos e substâncias teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas¹.

No Brasil a fiscalização da qualidade dos efluentes não é feita de forma adequada e efetiva devido à falta de tecnologias de monitoramento de baixo custo e de recursos humanos, não há uma fiscalização adequada da qualidade dos efluentes lançados. Apenas análises físicas e exames químicos, usualmente empregados, não são suficientes para avaliação dos efeitos potenciais na biota aquática e, conseqüentemente, no estabelecimento de procedimentos para protegê-la³.

A avaliação do comportamento de poluentes no ambiente através do monitoramento da sua ação em organismos vivos é denominado biomonitoramento. O fundamento desse método é que um estímulo ambiental, como um estímulo proveniente de um poluente, provoca reações no organismo vivo que podem acarretar várias alterações em seu funcionamento e sobrevivência, ou seja, o comportamento do organismo frente a um agente estressor é utilizado na avaliação da qualidade de um ambiente⁴.

O biomonitoramento fornece informações a respeito de sobrecargas lançadas no ambiente e da necessidade de medidas de proteção. Ele funciona como um controle do sucesso dos procedimentos técnicos adotados e como fator de decisão para a proteção ambiental. Além de fornecer informações importantes que podem ser necessárias na indicação do responsável pelos efeitos provocados, mesmo quando o agente estressor se encontra na faixa de limite aceitável⁴.

O biomonitoramento dos efeitos tóxicos nos organismos não humanos engloba o conceito e as práticas da Ecotoxicologia. O termo Ecotoxicologia foi criado por René Truhaut em 1969 como uma extensão da Toxicologia, para designar o estudo dos efeitos dos contaminantes sobre os ecossistemas, já que a Toxicologia clássica lida apenas com os efeitos sobre os seres humanos. Naquela época, já se demonstrava a crescente preocupação de cientistas e autoridades em estudar e compreender os efeitos deletérios promovidos por substâncias químicas, principalmente as de origem antrópica, sobre os ecossistemas e seus bioconstituintes e suas inter-relações. A aplicação prática deste termo não é tão simples, uma vez que os ecossistemas são bastante complexos⁵.

Estudos ecotoxicológicos são capaz de responder preditivamente à ecotoxicidade de novos compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotóxicos e sua capacidade de

ação a partir da obtenção de curvas dose-efeito e dose-resposta. Os resultados provenientes dessas curvas podem proibir ou liberar o uso de novos produtos químicos, ou seja, a Ecotoxicologia é uma ciência, com objetivo próprio de estudo (o fenômeno da intoxicação ambiental em todas as suas nuances e conseqüências), com finalidade (impedir e prevenir determinada intoxicação ou saber como interrompê-la, revertê-la e remediá-la) e com método⁵.

As metodologias de biomonitoramento ecotoxicológico podem ser empregadas como ferramentas de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas de maneira a detectar impactos acidentais ou decorrentes da implantação de empreendimentos produtivos. Podem servir ainda como instrumento regulador, sendo utilizadas como prova cientificamente aceita das alterações ambientais provocadas por ações criminosas.

Uma vez definido o objetivo do monitoramento, deve-se pensar em selecionar qual o indicador apropriado. O uso de organismos como indicadores da qualidade da água é relativamente recente e vem sendo muito utilizado nos últimos anos devido à exigência de medidas cada vez mais específicas na análise dos poluentes. Os organismos indicadores são aqueles que, devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental quando expostos a determinado poluente. As primeiras respostas à contaminação ambiental ocorrem nos níveis mais baixos de organização biológica (bioquímico e fisiológico dos organismos), e por essa razão elas representam medidas rápidas e de maior sensibilidade na análise da contaminação ambiental.

Os organismos indicadores são utilizados em testes para determinar o grau de toxicidade de amostras ambientais. Esses testes são os bioensaios ou testes de toxicidade que envolvem a exposição de um organismo a uma determinada condição ou fator para determinar sua resposta. Apresentam uma série de normas e procedimentos que devem ser seguidos para que a resposta seja considerada válida. Assim, são realizadas as séries de diluição, o controle negativo e o positivo. As séries de diluição são utilizadas para medir em que concentração o material a ser testado apresenta efeitos sobre determinada população. O controle negativo é uma população exatamente igual à que se encontra em testes, mas sem a adição do contaminante. Isso ajuda a determinar até que ponto os

efeitos podem ter acontecido por outro fator qualquer. Utiliza-se como controle positivos compostos comprovadamente tóxicos, em concentrações já padronizadas para cada linhagem, a fim de verificar a qualidade dos organismos-teste.

Um destes testes é o de toxicidade aguda que é relativamente rápido e de baixo custo baseando-se na mortalidade como efeito adverso. Por essa razão, ignora-se efeitos crônicos que representam perturbações importantes, as quais impedem que o organismo realize suas funções no ecossistema (morte ecológica), inclusive podendo progredir para a morte. Muitos efeitos indiretos e subletais podem ocorrer a médio ou longo prazo, em diferentes intensidades, podendo causar a redução das populações das espécies atingidas^{6,7}. Entre os efeitos estão: a dificuldade na localização de presas, problemas na percepção química e motora, inibição da desova, aborto, deformação de órgãos reprodutores, perda de membros, alterações respiratórias, alterações na taxa de fotossíntese, desenvolvimento de carcinomas. Os testes de toxicidade crônica são bons na determinação desses efeitos subletais, porém tem longa duração e custos mais elevados.

A avaliação da qualidade das águas permite geralmente a obtenção de resultados pontuais, que representam apenas a situação do momento da tomada das amostras. Para que se obtenham dados representativos da variação temporal da qualidade das águas em ambientes como rios, mares e lagos, necessita-se de uma grande quantidade de amostras, tomadas a intervalos regulares. Isto requer implicações de custo e esforço logístico.

Estudos recentes indicam que a avaliação rápida e de baixo custo pode ser realizada utilizando métodos de biomonitoramento em tempo real através de respostas comportamentais de invertebrados e peixes^{8,9,10}.

O biomonitoramento em tempo real faz uso de organismos aquáticos para fornecer um aviso adiantado da presença de substâncias tóxicas na água. Este conceito tem sido aplicado no monitoramento de efluentes industriais para detectar processos incompletos em Estações de Tratamento de Efluentes, no auxílio a agravos ambientais devido a derramamento tóxico acidental/intencional ou no monitoramento de fontes de água potável utilizadas para o abastecimento público de água.

Os sistemas de advertência utilizados têm as seguintes características básicas¹¹:

- Os organismos são mantidos em laboratório ou em campo sob circunstâncias controladas e expostos, em uma base freqüente ou contínua do fluxo, ao efluente ou à água que estão sendo avaliados.
- Parâmetros fisiológicos ou comportamentais do organismo são monitorados por dispositivos que armazenam e comparam a uma faixa de comportamento normal do biosensor (espécie sentinela que gera respostas associadas a parâmetros externos), passando a responder às circunstâncias anormais indicadas pelo organismo.
- A função do organismo sentinela é, primeiramente, detectar mudanças na toxicidade em um curto prazo da fonte a qual ele está sendo exposto.

Marcucella & Abramson¹² definiram “toxicologia comportamental” como as mudanças do comportamento de um organismo, induzida pelo estresse, que excede o limite normal de variabilidade.

Em geral o uso do termo “comportamento” tem significados diferentes e pode ser agrupado em dois significados básicos: (1) é comportamento todo ato motor de um animal; (2) é comportamento todas as interações de um animal com seu ambiente, como organismo, e não somente os atos motores¹³. Essa segunda definição apresenta duas acepções básicas: por um lado, o comportamento é uma espécie de “fisiologia de segunda ordem”, que se refere não à fisiologia do sistema ou à parte dele, mas do conjunto de sistemas, e assim inclui tudo aquilo que normalmente é caracterizado como “psicológico” – como memória, percepção, etc.¹³.

A pesquisa comportamental pode ser de dois tipos: centrada em espécies, ou centrada em comportamentos. No primeiro tipo de pesquisa, em geral identificada com a zoologia e etologia clássica, bem como com a ecologia comportamental, o objetivo é conhecer características particulares do comportamento de uma espécie, e, comumente, compará-lo com o de espécies próximas ou de ecologia similar. No segundo tipo, o objetivo é a dedução de uma lei geral de comportamento, válida para um grande número

de espécies¹³. Portanto, a análise de um comportamento implica em manipular variáveis biológicas e/ou ambientais e mensurar um padrão de ação definido.

Na avaliação de impactos em ambientes aquáticos, os peixes têm grande importância por estarem situados no topo da cadeia alimentar podendo indicar a contaminação persistente e bioacumulativa em níveis tróficos mais baixos. Estão imersos em seu ambiente físico e químico e, por isso, interagem constantemente com poluentes reativos nesse meio.

Os estudos comportamentais com peixes possuem uma longa tradição que remonta ao advento da psicologia científica. Thorndike¹⁴ utilizou a espécie *Fundulus sp* em estudos de labirinto. Lorenz¹⁵ executou diversos estudos etológicos com peixes ciliáceos. Peixes como o *Danio rerio* (Paulistinha, *Zebrafish*) são utilizados como modelos de organismos biosensores em estudos ecotoxicológicos.

Segundo Little & Finger⁸, que revisaram a literatura toxicológica para avaliar o comportamento de natação como indicador de toxicoses subletais em peixes, até o início da década de 90, nenhum procedimento padronizado envolvendo valor numérico ou escala de valores existia para medir amplamente qualquer variável da atividade natatória para qualquer espécie aquática.

Segundo Gouveia¹³, que revisou os estudos comportamentais realizados com peixe, o animal mais utilizado foi o “goldfish” (*Carassius auratus*), seguido de *Danio rerio* (paulistinha, “zebrafish”). Sendo os experimentos com o “zebrafish” os mais recentes, tal aparecimento de artigos com o este peixe pode refletir a disseminação do seu uso como modelo biológico de desenvolvimento e como biosensor, motivo que levou à escolha da espécie no desenvolvimento deste estudo.

A capacidade natatória é uma medida de orientação para a corrente de água, bem como a capacidade física para nadar contra ela. A atividade natatória inclui variáveis como frequência e duração dos movimentos, velocidade e distância percorrida durante o movimento, frequência e ângulo dos giros, posição na coluna d'água, forma e padrão de natação⁸.

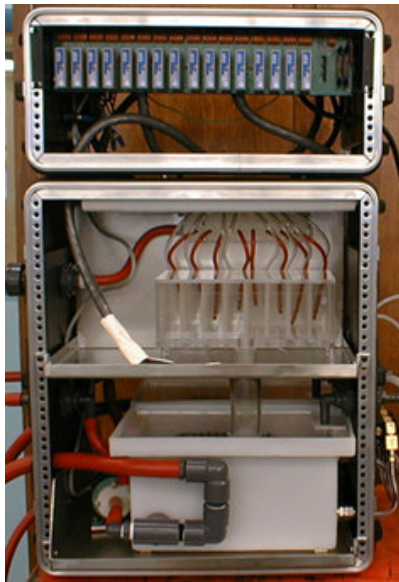
Dentro da hierarquia da organização biológica, o comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais¹⁶. Dessa forma, tem sido explorado em vários sistemas biosensores para a detecção de alterações ambientais através da análise de imagem em tempo real^{17,18,19,20,21}.

O desenvolvimento de programas computacionais, em conjunto com a evolução dos equipamentos de captura e registro de imagem, tanto analógica quanto digital, possibilitou a abertura de uma nova perspectiva metodológica para a avaliação toxicológica em tempo real^{22,23,24,25,26,27}.

1.1. SISTEMAS DE BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL EM OPERAÇÃO NO MUNDO

A maioria dos métodos de biomonitoramento empregados nas duas últimas décadas permaneceram no estágio de laboratório. Apenas uns poucos foram testados em condições de campo e realmente alguns estão disponíveis comercialmente.

Atualmente a Marinha americana (EUA) vem desenvolvendo e aperfeiçoando no “U.S. Army Center for Environmental Health Research” equipamentos para biomonitoramento em tempo-real, operando uma estação automatizada utilizando peixes como organismos sensores para avaliar a eficiência de uma estação de tratamento criada com o objetivo de monitorar o processo de despoluição de lençóis freáticos contaminados por resíduos da produção e armazenamento inadequado de produtos para fabricação de armamentos em uma base Naval⁹. Possui ainda uma versão portátil, *IABS - AC 1090 – Intelligent Aquatic BioMonitoring System*[®], para ser particularmente usada em estações de tratamento de efluentes e reservatórios de abastecimento de água. Este equipamento tem sido usado com sucesso em um dos reservatórios de água que abastece a cidade de Nova York (Figura 1).



Respostas: Taxa ventilatória, força de ventilação, taxa de “cough” e taxa de movimento do corpo. Avalia cada peixe individualmente e quando seis ou mais peixes se comportam anormalmente, o computador emite um alarme notificador e começa uma coleta de água automática para permitir a avaliação por análise química.

Figura 1 -Biomonitor aquático de comportamento de peixe usando pares de eletrodos montados acima e abaixo de cada câmara para oito peixes. Assim que o peixe se move na câmara e movimentada suas guelras, as contrações dos músculos geram sinais elétricos na água que são monitorados por um computador²⁸.

Várias universidades americanas também têm investido na aplicação do biomonitoramento em tempo-real. Podemos citar a parceria entre a Marinha Americana (U. S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine) e a Universidade de Maryland (Aquatic Pathobiology Center), com a implantação de um sistema denominado Sistema de Proteção Ambiental em Tempo-Real, para monitoramento de rios na Baía de Chesapeake²⁹.

A Universidade do Norte do Texas desenvolve um projeto denominado “CLAM”, sistema baseado no comportamento de abertura das valvas em moluscos bivalves³⁰. Investimentos semelhantes têm sido desenvolvidos em empresas privadas (Biosensor[®]), para avaliação de toxicidade em rios ou outras perturbações provocadas por efluentes industriais³¹.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) vem avaliando o desempenho de vários biosensores fabricados nos EUA e na Europa, que incluem os sistemas: 1. DaphTox - BBE (monitora o comportamento natatório de peixes e Daphnias), 2. AlgaeTox (mede a eficiência fotossintética), 3. Bivalve Monitor (comportamento de abertura das valvas de moluscos bivalves - University of North Texas/U.S. EPA), 4. Real-

Time Environmental Protection System (comportamento ventilatório em peixes, USACEHR/GeoCenters), e 5.ToxControl (Microlan). Os resultados demonstram que esses biosensores são muito sensíveis. Por exemplo, o DaphTox é capaz de detectar concentrações menores do que 150 µg/L de cádmio durante uma exposição de 2 horas, enquanto, o sistema ventilatório de peixe pode detectar concentrações tão baixas quanto 31.25 µg/L.

Na Comunidade Européia (CE), em particular no Reino Unido, o monitoramento contínuo é baseado em respostas eletrofisiológicas de trutas em cativeiro, onde os peixes são mantidos conectados permanentemente a eletrodos. O peixe ao ser exposto a um estressor é capaz de detectar alterações na qualidade da água através de emissão de sinais. Este dispositivo é patenteado e comercializado na Europa sendo denominado de MARK III³¹. A Alemanha detém os sistemas mais sofisticados e mantém uma extensa rede de estações de biomonitoramento em tempo-real, utilizando algas, peixes e moluscos³³. Somente na bacia do rio Reno foram instaladas 32 estações de biomonitoramento estabelecidas em contêineres fixados próximos a margens de rios onde um sistema utilizando peixes como biosensores vem sendo empregado para monitorar a qualidade das águas superficiais.

1.2. PROBLEMA

No Brasil, até o momento, não existe nenhum sistema de biomonitoramento em tempo real disponível. Os únicos estudos sobre biomonitoramento em tempo real foram realizados na década de 80 pelo Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais juntamente com pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA). Embora tenham desenvolvido e patenteado um sistema utilizando o princípio de que são geradas alterações no campo elétrico do peixe elétrico *gymnotus carapo*, quando submetido a estressores ambientais, como forma de detecção da perda na qualidade das águas, esse sistema resultou apenas em trabalhos para literatura científica, não alcançando fins comerciais e, hoje, encontra-se desativado.

O desenvolvimento dessa ferramenta de monitoramento será bastante útil na predição de ondas tóxicas e no controle de Estações de tratamento de efluentes, visto que, atualmente, o controle dos descartes de efluente industriais depende, principalmente de análises físico-químicas, que nem sempre detectam o dano causado pelos mesmos e não predizem a sua toxicidade; ou seja, não são suficientes para avaliação dos efeitos potenciais na biota e na saúde humana.

Um dos ramos industriais que apresenta maior potencial de toxicidade no seu efluente é o Têxtil. O efluente gerado na indústria têxtil tem composição variada, dependendo dos processos utilizados pela indústria, sendo esta variação um dos maiores responsáveis pela grande dificuldade em tratá-los. O efluente final têxtil é caracterizado pela concentração de substâncias orgânicas e pelas altas concentrações de corantes^{35,36}. No entanto, a quantidade de substâncias auxiliares utilizadas nesse processo industrial é muito maior do que as de corante e pouco se sabe sobre o efeito dessas substâncias auxiliares no ambiente³⁷.

1.2.1 A Indústria Têxtil

A implantação da indústria têxtil no Brasil ocorreu após a proclamação da independência em 1822, no período que vai de 1844 até o final da 1ª Grande Guerra³⁸. O perfil do setor têxtil no Brasil, segundo o censo industrial/econômico do IBGE/1985, conta com 5.570 estabelecimentos têxteis, este número expresso por classes e gêneros de indústrias atuantes em atividade de toda ordem. Segundo dados do Banco Nacional de Desenvolvimento do Extremo Sul³⁹ o setor é composto por aproximadamente 3.700 empresas têxteis e 14.700 confecções.

A) Os Impactos Ambientais do Setor Têxtil

De acordo com Sewekow⁴⁰, há alguns anos, começaram a aparecer reportagens em jornais e na televisão, especialmente na Alemanha, a respeito de um potencial nocivo das roupas para a saúde humana. Alguns casos reais foram apresentados, entre eles: (1) irritações na

pele devido a tecidos que continham formaldeído em excesso, (2) o caso de um vendedor contaminado com *lindane*, supostamente devido à contaminação pelo manuseio dos tecidos. Adicionalmente, os jornalistas alertavam sobre os corantes carcinogênicos ou aqueles que poderiam decompor-se em compostos carcinogênicos pela redução enzimática ou, em geral, pelos compostos químicos têxteis, os quais ainda não tinham sido avaliados toxicologicamente.

Ainda segundo Sewekow⁴⁰, algumas das críticas, suposições e acusações direcionadas contra a industrial têxtil incluem:

- a publicação do livro "Doenças de Guarda-Roupa";
- sensibilidade (efeitos alérgicos) aos corantes azo, ao formaldeído, a agentes óticos e amaciantes;
- resíduos tóxicos de pesticidas e agentes para preservação do algodão e da lã como o pentaclorofenol;
- corantes sintéticos;
- uso de pesticidas nas culturas de algodão como o DDT e o *lindane* (hexaclorociclohexano);
- uso de fertilizantes artificiais nas culturas de algodão;
- alto consumo de água e energia no processo produtivo;

B) Processos e efluentes líquidos da indústria têxtil

As indústrias têxteis, para efeito de estudo de seus efluentes, são agrupadas em três categorias principais: tecidos de algodão, de lã e sintéticos. Os efluentes provenientes de um processo com lã possuem, normalmente, pH ácido enquanto processos com algodão têm efluentes alcalinos. As operações de limpeza, tingimento e acabamento na indústria têxtil dão origem a uma grande quantidade de efluentes.

O que mais prejudica a indústria têxtil é o elevado consumo de água, fazendo com que esse segmento ocupe o 4º lugar mundial de indústrias com alto potencial poluidor. O maior consumo de água, e conseqüentemente a maior geração de efluentes, está nas etapas de lavagem, tingimento e acabamento. A carga de poluente presente neste efluente

está diretamente relacionada com a fibra do tecido cru. Além dos corantes, pigmentos e produtos auxiliares, o efluente têxtil apresenta grande quantidade de compostos orgânicos e inorgânicos, fazendo com que este tipo de efluente apresente toxicidade à vida aquática, pois diminuem o oxigênio dissolvido e modificam as propriedades e características físicas dos cursos d'água⁴¹.

Existem inúmeros processos de fabricação na área têxtil, dependendo do tipo de produto a ser manufaturado. Basicamente, existem quatro etapas de produção, cada qual com um produto final passível de ser comercializado, o que as torna etapas independentes. As etapas são: beneficiamento, fiação, tecelagem, e confecção. A seguir segue, resumidamente, a caracterização de alguns processos responsáveis pela composição dos efluentes⁴²:

Matéria-prima

Depois da obtenção do algodão cru, a fase seguinte é a fabricação dos fios.

Preparo da fiação e fiação propriamente dita.

O algodão é processado em diferentes equipamentos. Não há despejo industrial em nenhum desses processos. No entanto, os principais impactos dessa área de produção são os níveis de ruído, o calor gerado pelas máquinas e o pó composto por partículas de algodão resultantes dos processos de fiação.

Tingimento de fios

Consiste em ferver os fios em soluções de hidróxido de sódio e detergente (cozimento), em água corrente (lavagem), mergulhando-os, a seguir, em solução contendo corantes *indantrenos* e naftóis (tingimento). Os fios tingidos em bobinas vão direto para a tecelagem e os tingidos em rolos seguem para a engomagem. Os efluentes de cor forte contêm basicamente: hidróxido de sódio neutralizado, detergentes e sabões. Esses efluentes são intermitentes e se originam de descargas das unidades supracitadas.

Engomação

Os fios crus chegam às unidades de engomação em rolos, passam por uma solução de goma fervida e vão formar os rolos engomados da tecelagem. Os efluentes são constituídos pelas águas de lavagem das panelas onde são preparadas as soluções de amido e pelas descargas das engomadeiras. São altamente concentrados, têm DBO elevada, constituindo-se, principalmente, de amido. O volume varia de 0,5 a 8 l/Kg de material processado, enquanto o pH varia de 7 a 9.

Tecelagem (malharia)

É o processo pelo qual os fios são transformados em tecidos. Trata-se de processo seco, não ocorrendo produção de efluentes. Do ponto de vista ambiental, os impactos da tecelagem são os níveis de ruído, calor e pó produzidos pelas máquinas.

Mercerização

É um tratamento físico-químico que envolve a impregnação do material têxtil, sob tensão, com soluções alcalinas em condições de temperatura e concentração rigorosamente controladas. Seu objetivo é o aumento do brilho e da absorção de água e de corantes, além da melhoria da resistência à tração e da estabilidade dimensional.

O processo de mercerização apresenta consumos de hidróxido de sódio que variam de 200g a 300g/Kg de produto seco.

Chamuscagem

É a queima da penugem do pano, obtida pela passagem do mesmo sobre grelhas acesas.

Desengomação e lavagem

O pano sai da unidade de chamuscagem e entra direto num saturador. Este aparelho destina-se a embebição do pano com enzimas, detergentes alcalinos quentes ou sabões e emolientes dissolvidos em água, com a finalidade de destruir as gomas. Após o período de embebição (2 a 10 horas em temperatura superior a 120°C) as enzimas destroem os amidos. A seguir, o pano passa por lavadeiras especiais. Os efluentes são formados,

principalmente, pelos produtos de decomposição da goma de amido e do reagente de hidrólise. O volume é relativamente baixo e a DBO alta, podendo contribuir com 50% da DBO total.

Cozimento("kiering") e lavagem

O cozimento é feito por meio de vapor, com hidróxido de sódio e pequenas quantidades de produtos químicos diversos.

Alveamento e lavagem

Nessa operação utiliza-se água oxigenada e/ou cloro, com finalidade de se obter a remoção da cor natural das fibras. Os efluentes são contínuos e resultam da mistura de cloro, hipoclorito, peróxido, bissulfito de sódio, hidróxido de sódio, ácido sulfúrico fraco, produtos tensoativos e outros.

Secagem

É feita em secadeiras, constituídas por uma série de cilindros aquecidos com vapor. Não há ocorrência de efluentes, já que a água condensada desses cilindros volta para as caldeiras.

Estamparia

Os tecidos são estampados por meio de rolos gravados ou de quadros com corantes. Os efluentes contêm corantes e, em alguns casos, hidróxido de sódio e goma.

Tinturaria

O pano é passado por uma solução de tinta, fixado e lavado. A fixação do corante ao tecido completa-se ao agregar-se o álcali, os mais utilizados são carbonato de sódio e hidróxido de sódio.

Os efluentes do tingimento são variados, por causa dos diferentes tipos de corantes e da maneira pela qual são aplicados; são volumosos, têm forte coloração e, alguns,

podem ser tóxicos. Possuem restos de produtos auxiliares como hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e outros.

Lavagem

Os panos estampados, tingidos por processo contínuo e os que se destinam direto ao acabamento, são lavados em ensaboadeiras. Nessas máquinas, os panos passam por 8 caixas. Das quatro primeiras caixas fluem continuamente efluentes altamente concentrados, em virtude de os panos receberem gomas, corantes e outros produtos químicos.

Vaporização (processo intermediário)

As vaporizadeiras são de dois tipos: as antigas, cujos efluentes são constituídos por água mais ácido acético que são lançados na rede de esgoto e as vaporizadeiras "Atos", que consomem água somente para umedecer com vapor, não produzindo efluentes.

Acabamento

É a última fase no processamento do pano. Consiste na aplicação de gomas e resinas que são secadas ou fixadas sob temperaturas controladas, a fim de que o tecido receba o toque solicitado pelo comprador, o que é feito por meio de processos mecânicos e químicos. Os efluentes são provenientes das lavagens do fular (cilindros), das máquinas e do piso. Contêm uréia, formol, trifosfato, amido, estearato, óleo sulforicinado, emulsões de resinas polivinílicas e sais de magnésio.

Os efluentes finais apresentam pH ente 8 e 11, têm uma turbidez coloidal acinzentada, a cor depende do corante usado com predominância, o teor de sólidos totais varia de 1000 a 1600 mg/l, a DBO, de 200 a 600 mg/l, a alcalinidade total de 300 a 900 mg/l, o teor de sólidos em suspensão de 30 a 50 mg/l e o teor de cromo, às vezes, é superior a 3mg/l. O volume é muito grande, variando de 120000 a 380000 litros por 1000 metros de tecido processado.

C) Características de Algumas Substâncias Auxiliares Utilizadas.

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

O ácido sulfúrico é um ácido mineral forte e sólido. Sua representação comercial é na forma de uma solução em água à 98,5% em peso, tendo aspecto de um líquido viscoso, de coloração variando do incolor a levemente amarelada. É miscível na água em qualquer concentração. É o ácido mais importante na indústria e no laboratório. Tem várias aplicações industriais e é produzido em quantidade maior do que qualquer outra substância (só perde em quantidade para a água). O poder econômico de um país pode ser avaliado pela quantidade de ácido sulfúrico produzida. A produção mundial, em 2001, foi de 165 milhões de toneladas, com um valor aproximado de 8 bilhões de dólares.

O principal uso engloba a fabricação de fertilizantes, o processamento de minérios, a síntese química, o processamento de efluentes líquidos, o refino de petróleo, desdobrante de gorduras na fabricação de estearina, refinação de óleos minerais, indústrias metalúrgicas, têxteis e galvanoplastia (limpeza e trabalhos em metais), fabricação de detergentes e cosméticos, indústrias de celulose. Na indústria têxtil está presente nos efluentes líquidos dos processos de Alvejamento e Tingimento⁴³.

É um irritante direto que resulta em efeito adverso no local de contato. A concentração de ácido sulfúrico é importante na determinação de efeitos. Por exemplo, pequenas quantidades de ácido concentrado irá provocar perfurações no trato gastrointestinal se engolido, a mesma quantidade de ácido diluída suficientemente não terá efeito. O mecanismo de toxicidade do ácido sulfúrico é a alteração do pH extra e intracelular, havendo evidências que exerce ação no controle de crescimento e diferenciação das células⁴³.

Formaldeído (CH_2O)

É um dos mais comuns produtos químicos de uso atual, é um composto líquido claro, sendo usado normalmente como preservativo, desinfetante e anti-séptico. É útil na confecção de seda artificial, celulose, tintas e corantes, soluções de uréia, tiouréia, resinas melamínicas, vidros, espelhos, explosivos, na confecção de germicidas, fungicidas agrícolas, na confecção de borracha sintética e na coagulação da borracha natural. É

empregado no endurecimento de gelatinas, albuminas e caseínas. É também usado na fabricação de drogas e pesticidas⁴⁴.

Na indústria têxtil é utilizado para dar firmeza nos tecidos e para promover a impregnação do corante no tecido, estando presente nos efluentes líquidos dos processos de tingimento e acabamento químico. Das substâncias relacionadas na norma Öko-Tex Standard100¹, a grande preocupação da indústria têxtil é o formaldeído, substância considerada cancerígena⁴⁵.

O Formaldeído é tóxico quando ingerido, inalado ou quando entra em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Em concentrações de 20 ppm (partes por milhão) no ar causa rapidamente irritação nos olhos. Sob a forma de gás é mais perigoso do que em estado de vapor⁴⁶.

É classificado como carcinogênico humano e têm sido relacionado com câncer dos pulmões e nasal e com possível câncer no cérebro e leucemia. Em quatro instituições internacionais de pesquisa foi comprovado o potencial carcinogênico do formaldeído⁴⁷:

- Em 1995, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou este composto como sendo carcinogênico para humanos (Grupo 1, julho 2004), tumorogênico, teratogênico por produzir efeitos na reprodução para humanos. Em estudos experimentais, demonstraram ser também para algumas espécies de animais.
- Agência de Proteção Ambiental (EPA), dos EUA: “O composto foi avaliado pelo grupo de avaliação de carcinogenicidade da ACGIH e foi considerado suspeito de causar câncer em humanos“.
- Associação de Saúde e Segurança Ocupacional (OSHA), dos EUA: considera que o agente é suspeito de causar câncer para humanos.
- O Programa Nacional de Toxicologia dos EUA (Fourth Annual Report on Carcinogens) de 1984 considerou que o formaldeído é um agente cancerígeno nas

¹ Norma do Instituto Australiano de Pesquisas Têxteis (Österreichische Textil-Forschungsinstitut) elaborada para testar as propriedades ecológicas de artigos têxteis e de vestuário para humanos.

seguintes doses para ratos: por via oral, 1170 mg/kg; por via dérmica 350 mg/kg e por via inalatória 15 ppm/6 horas.

Hidróxido de sódio (NaOH)

O hidróxido de sódio, também conhecido como soda cáustica, é um irritante potente e corrosivo. Pode causar queimaduras e danos permanentes em tecidos que entrem em contato com a substância. Pode também causar hidrólise de proteínas⁴⁸.

É usado na indústria (principalmente como uma base química) na fabricação de papel, detergentes e tecidos. Na indústria têxtil é empregado em seis processos: na Mercerização das fibras, Purga, Cozinhamento e Pré-alveamento, Alveamento e Tingimento, conferindo ao tecido aspecto brilhante, aumento de resistência e maciez e maior afinidade com os corantes, sendo um dos compostos auxiliares mais presente no efluente têxtil⁴⁹.

Portanto, este projeto utilizou essas substâncias auxiliares presentes no efluente têxtil, como modelo experimental, para avaliar a percepção e velocidade de resposta do peixe biosensor, exposto a concentrações subletais dessas substâncias, padronizando um procedimento metodológico de análise comportamental em laboratório que poderá ser utilizado em avaliações em tempo real de corpos d'água, garantindo a boa qualidade das águas para abastecimento público e a manutenção da biota aquática. Além disso, o desenvolvimento de sistemas capazes de detectar níveis subletais de toxicidade irá fortalecer a responsabilidade legal, ecológica e de vigilância. Sendo uma ferramenta de avaliação preditiva, poderá ser utilizada na fiscalização pública, ou até mesmo por empresas, para garantir a eficácia de seus tratamentos de rejeitos antes de serem lançados no ambiente.

Como foi dito por Cairns & Mount⁵⁰: “*Nenhum aparelho instrumental, até hoje inventado, pode medir toxicidade! Concentrações químicas podem ser medidas por instrumentos, mas somente materiais vivos podem ser usados para avaliar toxicidade*”. Entre os benefícios conferidos ao biomonitoramento sobre os métodos de avaliação química da água estão a coleta instantânea de dados, o aumento da eficiência em termos

de custos e acurácia e a relevância ecológica. O sucesso do desenvolvimento se dá por ser um sistema que gera informações biológicas reais, rápidas e economicamente viáveis que dará respostas do potencial de degradação do ambiente.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do uso de um sistema de análise de imagem em tempo real para registro de padrões comportamentais da atividade locomotora de um biosensore submetido a estressores químicos específicos, visando desenvolver a base metodológica para a implantação de um sistema de biomonitoramento em tempo-real que funcione como mecanismo de controle da qualidade de efluentes ou como sistema de vigilância da qualidade de águas superficiais e subterrâneas em procedimentos de rotina em testes toxicológicos de laboratório.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar, através de testes toxicológicos agudos para *Danio rerio*, a CL_{50} para ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e formaldeído, 3 substâncias auxiliares do processo industrial têxtil.
- II. Determinar o potencial tóxico dessas substâncias auxiliares, em concentrações subletais, tendo por base a CL_{50} , utilizando como resposta o comportamento natatório de peixes em um sistema de biomonitoramento por análise de imagem em tempo real.
- III. Determinar a quantidade dessas substâncias auxiliares que o organismo biosensor consegue detectar em 2 horas de exposição.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1. ORGANISMO-TESTE

O peixe *Danio rerio* (HAMILTON, 1822), conhecido como paulistinha ou “zebrafish”, da ordem dos Cypriniformes e família Cyprinidae (Figura 2), foi utilizado como organismo biosensor. A espécie tem origem asiática, podendo ser encontrado no Paquistão, Índia, Nepal e Blangadesh⁵¹.

Por ser capaz de se adaptar facilmente às variadas condições ambientais naturais e artificiais e foi utilizado já a partir dos anos 30 para pesquisas científicas⁵², sendo um dos peixes mais estudados mundialmente.

No Brasil é comercializado como peixe ornamental, não ocorrendo naturalmente nas bacias hidrográficas brasileiras. Foi escolhido como biosensor neste estudo pois está disponível comercialmente em muitos países, é facilmente criado em laboratório, apresenta sensibilidade satisfatória para ampla gama de substâncias químicas, além de ser um dos organismos mais utilizados e estudados no mundo para investigação do desenvolvimento biológico e em testes toxicológicos⁵³.



Figura 2 – organismo- teste: peixe *Danio rerio*

Foram utilizados exemplares adultos do peixe *Danio rerio*, com cerca de 120 dias de idade e de ambos os sexos, adquiridos em um fornecedor comercial licenciado pelo Ministério da Agricultura.

4.1.1 Manutenção dos peixes em laboratório

Os peixes foram mantidos em laboratório em aquários com capacidade de 80 litros (figura 3), preenchidos com 50L de água de abastecimento público, filtrada, desclorada e permanentemente aerada, mantidos numa proporção de 1 (um) peixe por litro, à $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os dias as excretas no fundo do aquário foram sifonadas com auxílio de uma mini-bomba. A alimentação foi baseada em ração para peixe (Spirulina 200), fornecida diariamente, e “minhoca de sangue” ou *Daphnia pulex*, fornecida a cada dois dias. Após uma semana de aclimação em laboratório, os peixes foram considerados aptos para utilização nos testes.



Figura 3 – Aquário de manutenção.

4.2. SUBSTÂNCIAS -TESTE

- Ácido sulfúrico P.A. 98%, marca Vetec;
- Formaldeído P.A. 37%, marca Isofar;
- Hidróxido de sódio P.A. em lentilhas, marca Pró-analysis.

4.3 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

O estudo foi realizado em duas etapas: na primeira foram realizados testes de toxicidade aguda e, na segunda foram realizados ensaios comportamentais.

4.3.1 Primeira etapa: Teste de toxicidade aguda²

Os procedimentos dos testes toxicológicos com peixes seguiram o padrão adotado pelos Manuais de Normas Técnicas da CETESB para testes toxicológicos com peixes⁵⁴ (Figura 4).

A água de diluição (água de abastecimento público filtrada e desclorada) foi aerada durante 1h antes do início dos testes. A temperatura ambiente da sala manteve-se entre $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12:12h claro/escuro. Os parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido (O.D.), pH e dureza total das águas de manutenção (água do aquário) e diluição foram medidos antes e depois dos testes. O oxigênio dissolvido final de cada concentração-teste foi medido a fim de validar o teste, visto que para teste agudo com peixe o O.D. final deve ser maior ou igual a 4 mg/L; o pH, para determinar as variações devido ao uso de ácido e base como substância-teste; e a dureza total que em aquários de manutenção para *D. rerio* deve ser até $300 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Foram preparadas 5 concentrações³ de exposição, sendo elas $3,57 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $3,94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $4,32 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $4,69 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $5,63 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ para o ácido sulfúrico, $5,23 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; $5,45 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; $5,63 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; $5,81 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; 6,18

² Não foi encontrado na literatura o valor da CL50 para *Danio rerio* para as substâncias-teste propostas.

³ No anexo 1 encontra-se uma tabela comparativa de unidades entre as concentrações utilizadas.

$\times 10^{-3}$ mol/L para formaldeído e $16,3 \times 10^{-4}$ mol/L; $17,5 \times 10^{-4}$ mol/L; $18,8 \times 10^{-4}$ mol/L; $20,0 \times 10^{-4}$ mol/L; $21,3 \times 10^{-4}$ mol/L para o hidróxido de sódio.

Distribuiu-se um total de 10 peixes adultos para cada concentração e para o controle. Esses 10 peixes foram divididos em 2 réplicas de 5 indivíduos para cada diluição. As concentrações-teste foram acondicionadas em cristallisadores de vidro de 5L preenchidos com 3L de solução-teste. Durante o período de exposição, as concentrações-teste não foram aeradas e nem os peixes foram alimentados (Figura 4).



Figura 4 - Teste de toxicidade aguda em sistema estático.

4.3.2 Segunda etapa: Registro comportamental em tempo real

Antes do início do experimento, 20L de água de diluição foram aerados por no mínimo 15 minutos (tempo suficiente para atingir teores de oxigenação entre 5,5 a 7,0 mg/L.). Antes do início do experimento foram coletadas amostras da água do aquário de manutenção e da água de diluição para análise físico-química.

O aquário teste é dividido em dois compartimentos com capacidade volumétrica de 10L, cada um contendo 4 boxes de registro. Um total de água relativo a 1000 vezes a quantidade, em unidade de volume (μ l), da substância teste a ser diluída foi retirada e reservada de ambos os compartimentos (controle e tratamento). Por exemplo, se fosse introduzido 140 μ l da substância, era retirada 140ml de ambos os compartimentos. A porção de água do tratamento conteve a substância-teste diluída.

Oito peixes selecionados aleatoriamente do aquário de manutenção, todos sob privação alimentar de 24h, foram transferidos, dois a dois, para os boxes de registro. Os

oito peixes foram divididos em dois grupos de quatro indivíduos, grupo controle e tratado, monitorados simultaneamente por um período de 4 horas.

O experimento durou 5h, sendo 1h de aclimação, para que os peixes se acostumem com os boxes de registro (não houve registro de dados), e 4h de monitoramento. O período de monitoramento foi dividido em duas horas iniciais onde ambos os grupos ficaram somente expostos à água de diluição e duas horas seguintes após a introdução das porções de água previamente retiradas, sendo a porção tratamento com a substância-teste diluída e a porção controle somente água de diluição. O grupo controle recebeu introdução da mesma quantidade de água para simular o mesmo estresse ao grupo tratado.

O tempo de duas horas foi escolhido baseado nos estudos de Van der Scalie⁵⁵, que concluíram que menos de uma hora é suficiente na detecção de concentrações próximas as de CL_{50} 96h para várias substâncias através de respostas ventilatórias de peixes, e Thomas⁵⁶, que determinaram 2h como o tempo máximo de exposição para simular uma resposta desejável de um sistema de biomonitoramento em tempo real.

Os peixes foram expostos a 10, 30, 50, e 70% da CL_{50} das substâncias-teste para avaliação do efeito tóxico sobre o comportamento de natação durante 2 horas de exposição. A atividade locomotora dos peixes foi monitorada por uma câmera de vídeo que envia as imagens para um aparelho denominado VIDEOMEX-V que as analisa registrando em forma de parâmetros comportamentais, como velocidade média (mm/seg), distância percorrida (mm) e três tipos de tempo, tempo ambulatorial (seg), tempo em repouso (seg) e tempo estereotipado (seg).

A velocidade média foi escolhida por ser a razão entre distância e tempo. Esse parâmetro foi registrado e quantificado em intervalos de 5 minutos (totalizando 48 intervalos de registro) e seus valores armazenados foram analisados para verificação da ocorrência de diferença significativa entre os grupos tratados e controle antes e depois da introdução da substância.

Dez minutos após a introdução da substância-teste foram coletadas duas amostras de água, uma do compartimento controle e outra do compartimento tratamento, para a

medição dos parâmetros O.D. e pH iniciais , e ao término do experimento, mais duas amostras foram coletadas para medição dos mesmos parâmetros.

Estes experimentos tiveram três réplicas, ou seja, 3 grupos controles e três tratamentos, totalizando um grupo amostral de doze peixes por concentração.

4.3.3 Descrição do sistema analisador de imagem em tempo-real

O sistema era constituído de 4 componentes: **a)** instrumento analisador de imagem denominado Videomex-V[®], que continha um software denominado “*distância percorrida de múltiplos objetos (MODT)*” que monitora cinco diferentes parâmetros comportamentais simultaneamente (distância percorrida, tempo ambulatorial, tempo estereotipado, tempo em repouso e velocidade média), tendo conectado em sua face posterior, através de um cabo axial, uma câmera de vídeo digital que envia a imagem digitalizada dos animais para um monitor, onde foram visualizadas como silhuetas formadas de pixels brancos, sobre um fundo preto; **b)** cabine de registro confeccionada em acrílico, com as dimensões de 36cm de comprimento (C) X 36cm de largura (L) X 45cm de altura (H), tendo instalado em sua face posterior um exaustor de 10 cm de diâmetro, para exaustão do vapor de água e compostos químicos voláteis que emanam do aquário-teste durante o monitoramento; **c)** aquário acrílico (70cm de C X 35cm de L X 25cm de H, capacidade = 40 litros) revestido com Insulfilm branco fosco, em seu interior havia uma câmara de acrílico opaca (câmara de exposição) com toda a área de sua superfície perfurada com orifícios de 3 mm de diâmetro, dividida em 8 boxes de contenção (9.5cm de C X 5cm de L X 2cm de H) (Figura 5). Para impedir a fuga dos peixes, as partes superiores dos boxes foram fechadas com tampas de acrílico removíveis. A câmara de exposição foi mantida submersa a 2,5cm de profundidade da superfície da água; **d)** microcomputador, que continha um software armazenador de dados em tempo real e gerador de planilha Excel[®], desenvolvido em nosso laboratório (Figura 5 e 6).

O aquário-teste possuía duas mini-bombas de água submersas que tinha como função a homogeneização do meio, após a introdução da substância-teste. Nas laterais da cabine de registro havia dois funis de vidro com tubo flexível de borracha de silicone que desembocavam um no compartimento controle e o outro no tratamento, para introdução da substância teste (Figura 5).

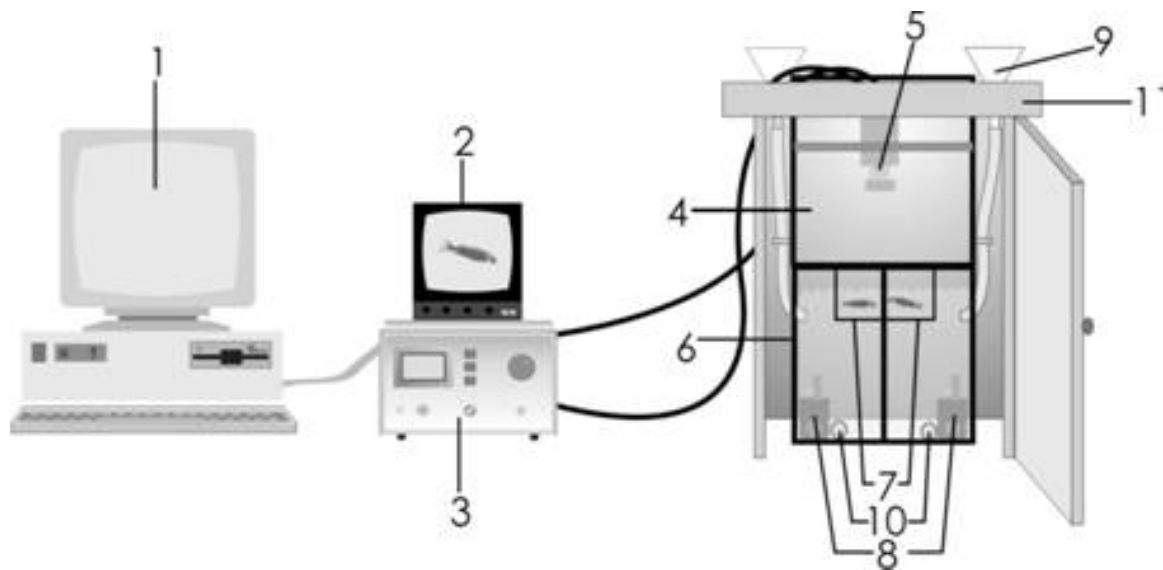
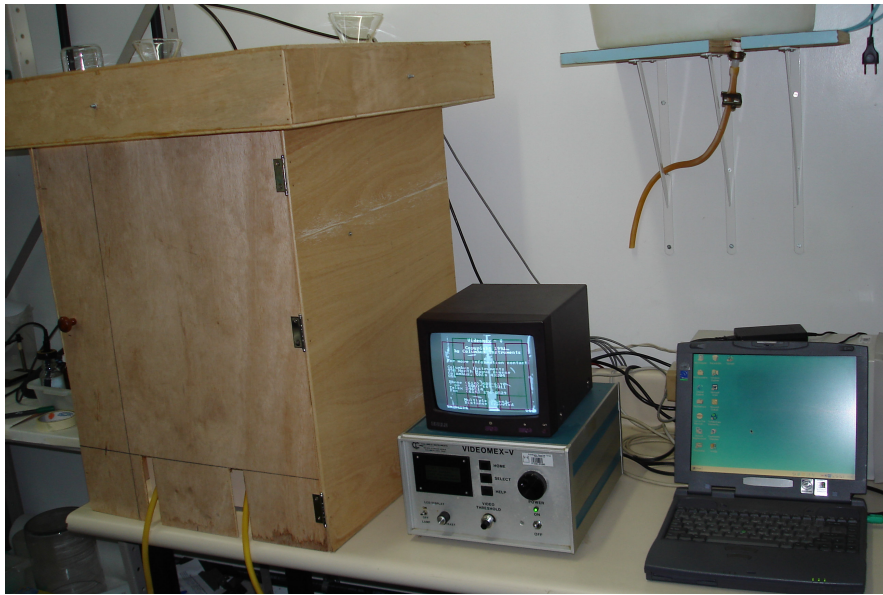
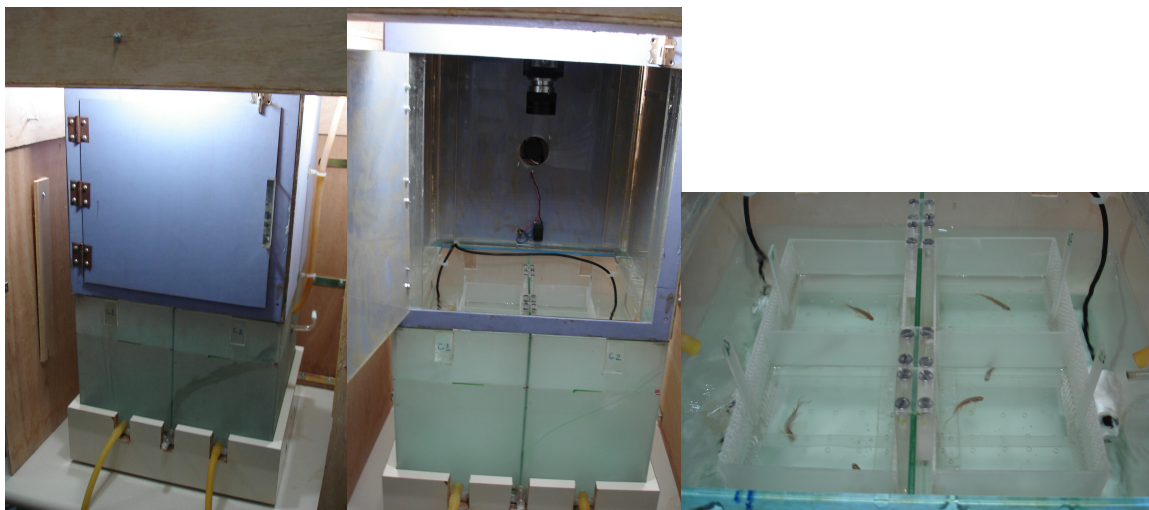


Figura 5 - Desenho esquemático do biomonitor: 1 = microcomputador contendo software armazenador de dados em tempo real e gerador de planilha Excel; 2 = monitor de vídeo; 3= analisador de imagens em tempo real Videomex-V[®]; 4 = cabine de registro em acrílico; 5 = câmera de vídeo; 6= aquário de acrílico; 7 = câmara de acrílico de exposição subdividida em 8 boxes de contenção; 8= bombinhas; 9 = funil de vidro com tubo flexível de borracha de silicone; 10 = saídas para escoamento dos compartimentos



(a)



(b)

(c)

(d)

Figura 6 – (a)Foto do sistema; (b) interior da cabine de madeira; (c)interior da cabine de registro, mostrando a câmera acima; (d) boxes de contenção com os oito peixes em compartimentos individualizados

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados do teste de toxicidade aguda foi utilizado o teste de *Trimmed Spearman Karber* para determinação da CL₅₀ em 24 horas de exposição.

As análises comportamentais do sistema de biomonitoramento foram conduzidas de duas formas:

1) por comparação entre grupo tratado e controle antes e depois, utilizando o teste de *Wilcoxon Matched Pairs Test* usando o pacote estatístico STATISTICA 4.2. Cada grupo de peixe serviu como seu próprio controle. Este procedimento foi adotado devido a variabilidade biológica entre eles, dessa forma, fez-se necessário um período de exposição equivalente em água pura para comparar com o período sobre tratamento. O grupo controle servirá apenas para excluir o possível estresse mecânico causado pela introdução de água no sistema. Foram considerados como *outlier* e retirados da análise os peixes que ficaram mais de três intervalos de registro (15 min) parado, ou seja, registrando velocidade média zero.

2) por comparação individual, cada 12 peixes expostos a cada concentração foi avaliado pelo tipo de resposta. Foi utilizado o teste de *Wilcoxon Matched Pairs Test* para determinar os peixes que não responderam, ou seja, os que não apresentaram diferença significativa na velocidade média após introdução da substância; e os demais peixes foram classificados, por análise de gráficos *Box plot*, como hiperativos, quando há uma resposta que gera o aumento da atividade natatória, e hipoativos, quando respondem através da diminuição da velocidade média.

5. RESULTADOS

O teste de toxicidade aguda para 24 horas de exposição indicou uma CL_{50} de $4,46 \times 10^{-4}$ mol/L para H_2SO_4 ; $5,74 \times 10^{-3}$ mol/L para CH_2O ; e de $16,5 \times 10^{-4}$ mol/L para NaOH. A tabela 1 ilustra o percentual de mortalidade em cada concentração do teste agudo.

Tabela 1 - Percentual de mortalidade por concentração para o teste de toxicidade aguda de 24 horas com o peixe *Danio rerio*.

Substância	Concentrações (mol/L)	%Mortalidade	$CL_{50}(24h)$ (mol/L)
Ácido Sulfúrico	Controle	0%	$4,46 \times 10^{-4}$
	$3,57 \times 10^{-4}$	0%	
	$3,94 \times 10^{-4}$	0%	
	$4,32 \times 10^{-4}$	10%	
	$4,69 \times 10^{-4}$	100%	
	$5,63 \times 10^{-4}$	100%	
Formaldeído	Controle	0	$5,74 \times 10^{-3}$
	$5,23 \times 10^{-3}$	0	
	$5,45 \times 10^{-3}$	10	
	$5,63 \times 10^{-3}$	50	
	$5,81 \times 10^{-3}$	60	
	$6,17 \times 10^{-3}$	100	
Hidróxido de sódio	Controle	0	$16,5 \times 10^{-4}$
	$16,3 \times 10^{-4}$	40	
	$17,5 \times 10^{-4}$	90	
	$18,8 \times 10^{-4}$	90	
	$20,0 \times 10^{-4}$	100	
	$21,3 \times 10^{-4}$	100	

A partir da CL_{50} foram calculadas as concentrações correspondentes, para testar o comportamento de reação ao estresse químico de cada substância, definidas como 10 %, 30%, 50 % e 70 % da CL_{50} , sendo estas, respectivamente, $0,45 \times 10^{-4}$ mol/L; $1,34 \times 10^{-4}$ mol/L; $2,23 \times 10^{-4}$ mol/L e $3,12 \times 10^{-4}$ mol/L para H_2SO_4 ; $0,57 \times 10^{-3}$ mol/L; $1,77 \times 10^{-3}$

mol/L; $2,87 \times 10^{-3}$ mol/L; $4,02 \times 10^{-3}$ mol/L para CH_2O ; e $1,6 \times 10^{-4}$ mol/L; $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L; $8,3 \times 10^{-4}$ mol/L; $11,55 \times 10^{-4}$ mol/L para NaOH, utilizando como parâmetro a velocidade média dos peixes. É importante salientar que todas estas concentrações são menores que a menor concentração onde houve mortalidade no teste agudo, sendo, portanto, subletais.

Os testes comportamentais foram válidos, já que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os controles que acompanharam cada concentração-teste antes e depois da introdução de água no sistema (Tabela 2), ou seja, não causou estresse mecânico, sendo os resultados aqui apresentados considerados como efeitos das substâncias (Figura 7).

A tabela 2 mostra o resultado do teste estatístico *Wilcoxon Matched Pairs Test* dos grupos controles e tratados para as concentrações-teste de cada substância, utilizando como parâmetro a velocidade média de duas horas de exposição sem a substância comparada às duas horas após a introdução da substância.

Os grupos tratados foram avaliados de duas formas: comparando a média da velocidade média do grupo entre os 24 intervalos de registro em água pura (antes) com os 24 intervalos seguintes (depois) com exposição à concentração correspondente e, dentro de cada grupo, comparando individualmente a velocidade média antes e depois para cada peixe exposto.

A análise de *Wilcoxon* do grupo tratado com 10% da CL_{50} do H_2SO_4 determinou que houve alteração significativa na atividade natatória do peixe *D. rerio* após a introdução da substância, respondendo com o aumento da velocidade média (hiperatividade); o tratamento de 30% da CL_{50} do H_2SO_4 não apresentou diferença significativa; enquanto que a concentração de 50% e 70% da CL_{50} causaram um comportamento de hipoatividade, ou seja, houve redução da velocidade média (Figura 8).

Tabela 2 - Resultado do teste estatístico *Wilcoxon Matched Pairs Test* dos grupos controles e tratados para as concentrações-teste de cada substância.

Grupo amostral	N	T	Z	p-level
Acido Sulfúrico				
Controle 10% Antes & Controle 10% Depois	24	102	1,37	0,170
Controle 30% Antes & Controle 30% Depois	24	81	1,97	0,050
Controle 50% Antes & Controle 50% Depois	24	140	0,29	0,775
Controle 70% Antes & Controle 70% Depois	24	105	1,29	0,198
Tratamento 10% Antes & Tratamento 10% Depois	24	80	2,00	0,045
Tratamento 30% Antes & Tratamento 30% Depois	24	142	0,23	0,819
Tratamento 50% Antes & Tratamento 50% Depois	24	52	2,80	0,005
Tratamento 70% Antes & Tratamento 70% Depois	24	10	4,00	<0,001
Formaldeído				
Controle 10% Antes & Controle 10% Depois	24	108	1,20	0,230
Controle 30% Antes & Controle 30% Depois	24	122	0,8	0,423
Controle 50% Antes & Controle 50% Depois	24	138	0,34	0,732
Controle 70% Antes & Controle 70% Depois	24	117	0,94	0,346
Tratamento 10% Antes & Tratamento 10% Depois	24	72	2,22	0,027
Tratamento 30% Antes & Tratamento 30% Depois	24	58	2,63	0,008
Tratamento 50% Antes & Tratamento 50% Depois	24	101	1,40	0,161
Tratamento 70% Antes & Tratamento 70% Depois	24	4	4,17	<0,001
Hidróxido de Sódio				
Controle 10% Antes & Controle 10% Depois	24	142	0,23	0,819
Controle 30% Antes & Controle 30% Depois	24	111	1,11	0,265
Controle 50% Antes & Controle 50% Depois	24	110	1,14	0,253
Controle 70% Antes & Controle 70% Depois	24	125	0,71	0,475
Tratamento 10% Antes & Tratamento 10% Depois	24	92	1,66	0,097
Tratamento 30% Antes & Tratamento 30% Depois	24	6	4.11	<0,001
Tratamento 50% Antes & Tratamento 50% Depois	24	10	4,00	<0,001
Tratamento 70% Antes & Tratamento 70% Depois	24	18	3,77	<0,001

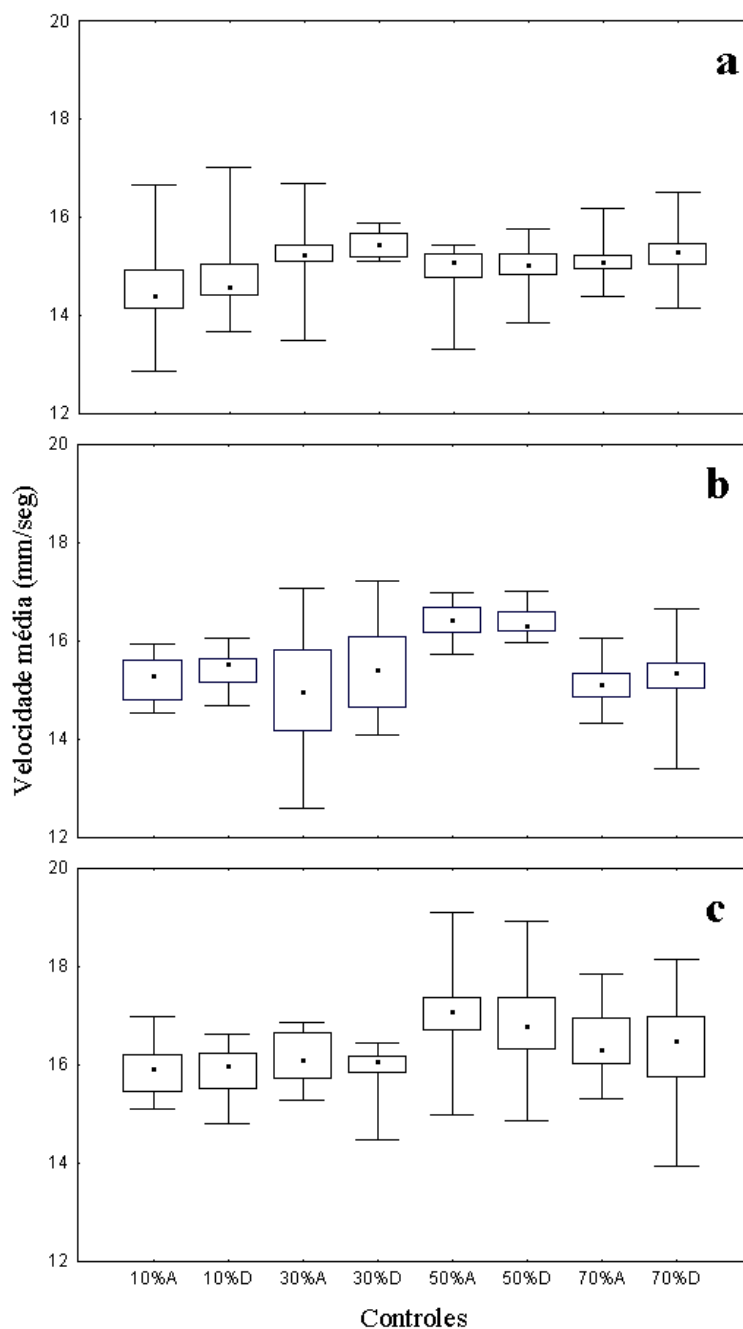


Figura 7 – Distribuição dos valores (máximo, mínimo, mediana e intervalo de 50% dos valores) da velocidade média dos grupos controles que acompanharam cada concentração testada antes e depois da introdução de água. A – velocidade média antes da introdução de água, D - velocidade média depois da introdução de água, a – teste do ácido sulfúrico, b – teste do formaldeído, c – teste do hidróxido de sódio.

A Figura 9 mostra as diferentes respostas a partir da análise individual dos peixes, esta avaliação indicou que: (1) na concentração de 10% CL₅₀ do H₂SO₄, 58,3% dos peixes tratados não responderam a substância, ou seja, não houve diferença significativa após a introdução da substância; 33,3% responderam através de hiperatividade; e 8,3% responderam de forma hipoativa, diminuindo a velocidade média; (2) a igualdade determinada pelo teste de Wilcoxon em 30% da CL₅₀ do H₂SO₄ pode ser explicada pela análise individual dos peixes desse grupo, onde 33,3% não responderam, 33,3% foram hiperativos e 33,3% foram hipoativo (devido à variação intra-específica, pode haver nesse grupo peixes suscetíveis e resistentes: a soma desses indivíduos, ou seja, a avaliação do grupo, leva a um comportamento próximo do normal, levando a uma resposta de que não houve efeito tóxico, por isso esses dados foram avaliados individualmente); (3) 50% e 70% da CL₅₀ do H₂SO₄ causaram hipoatividade em 58,3% e 50% dos peixes, respectivamente. Desses resultados é importante observar a tendência da diminuição da resposta de hiperatividade com o aumento da concentração acompanhada do aumento de hipoatividade.

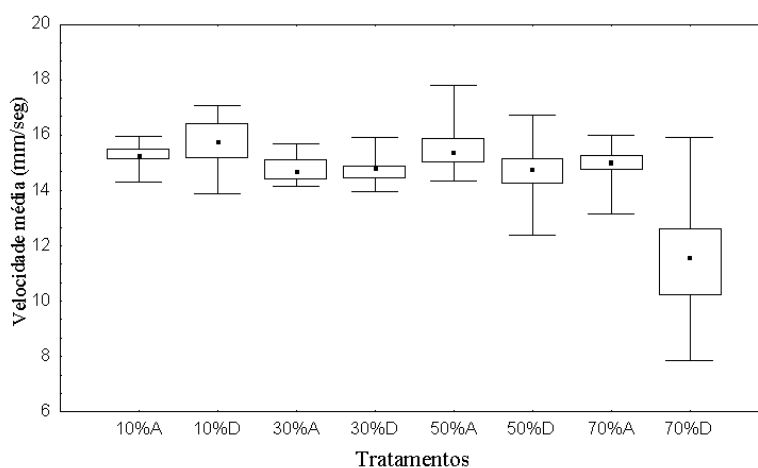


Figura 8 – Distribuição dos valores (máximo, mínimo, mediana e intervalo de 50% dos valores) da velocidade média (mm/seg) dos grupos tratados com ácido sulfúrico antes e depois da introdução da substância em cada concentração testada. A – velocidade média antes da introdução da substância, D - velocidade média depois da introdução da substância.

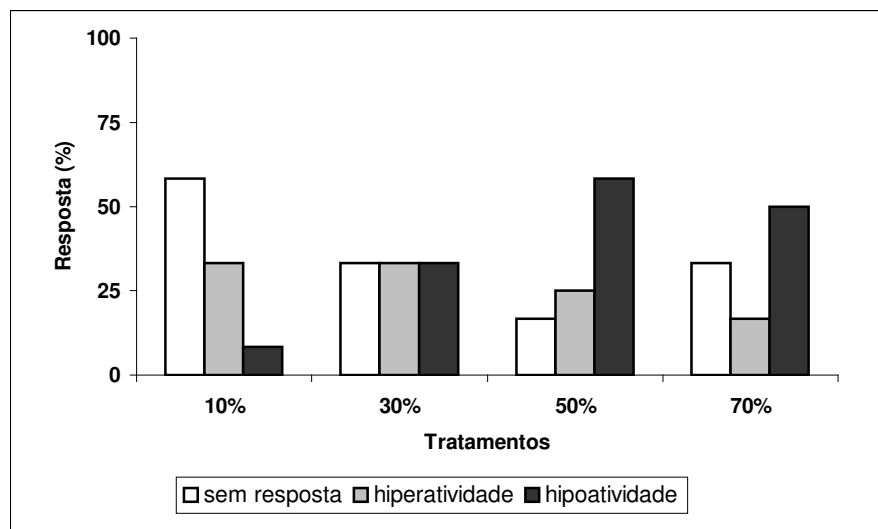


Figura 9 – Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao ácido sulfúrico.

A avaliação dos grupos tratados com CH_2O revelou que a concentração de 10% da CL_{50} causou resposta de hipoatividade (Figura 10), mas na avaliação individual houve maior percentual de hiperatividade, 50% dos peixes foram hiperativos, 25% não responderam e 25% foram hipoativos (Figura 11); essa hipoatividade do grupo pode ter sido expressa devido aos peixes que não responderam terem valores de velocidade média baixos, levando a um comportamento geral (média do grupo) de hipoatividade (Figura 12). A concentração de 30% da CL_{50} também levou a diminuição da atividade locomotora; 50% da CL_{50} não causou efeito sobre a velocidade média, embora a avaliação individual tenha definido que 45% dos peixes não responderam e 55% responderam, igualmente, com hiperatividade ou hipoatividade. Ainda avaliando o grupo, a concentração de 70% causou aumento da velocidade média. Na avaliação individual de todas as concentrações-teste de CH_2O *D. rerio* não seguiu um padrão dose-resposta, mas houve maior incidência da resposta de hiperatividade comparadas as de hipoatividade (Figura 11).

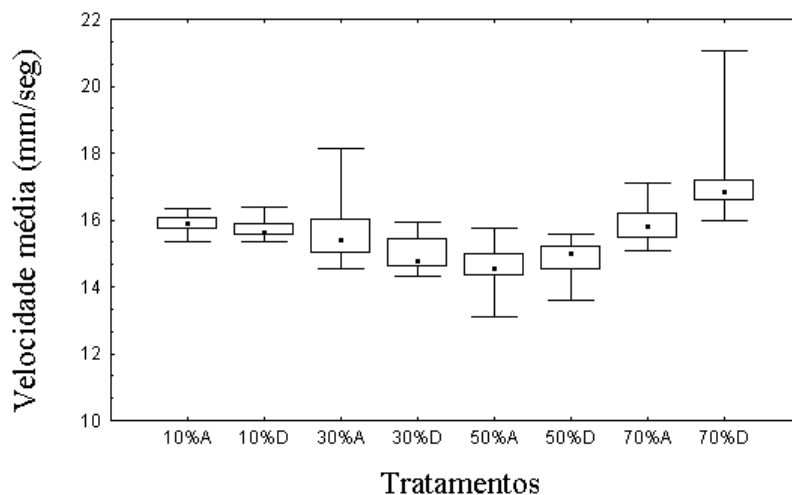


Figura 10 – Distribuição dos valores (máximo, mínimo, mediana e intervalo de 50% dos valores) da velocidade média (mm/seg) dos grupos tratados com formaldeído antes e depois da introdução da substância em cada concentração testada. A – velocidade média antes da introdução da substância, D - velocidade média depois da introdução da substância.

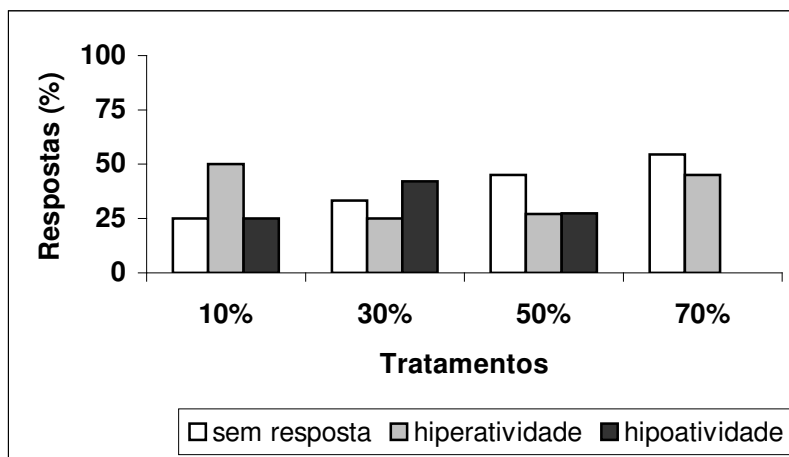


Figura 11 - Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao formaldeído.

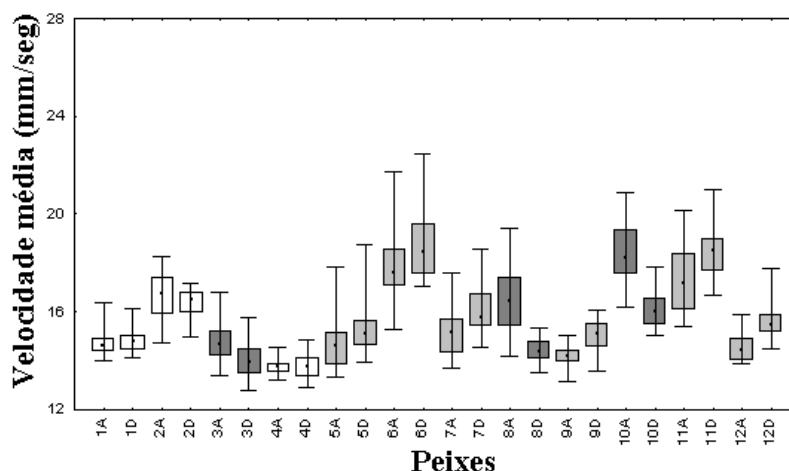


Figura 12 - Resposta comportamental de cada peixe exposto a concentração de 10% da CL_{50} do formaldeído (máximo, mínimo, mediana e intervalo de 50% dos valores). A – antes da introdução da substância; D – depois de introduzir a substância; □ -sem resposta; ■ Hiperatividade; ■ Hipoatividade.

O hidróxido de sódio não foi capaz de causar efeito sobre o comportamento do grupo exposto a concentração de 10% da CL_{50} , porém, a partir desta gerou hipoatividade crescente conforme aumento da concentração (Figura 13). Na avaliação individual a maioria dos peixes também responderam de forma hipoativa, com exceção da concentração de 10% onde 67% dos peixes não responderam. Nas concentrações de 30% 50% e 70% da CL_{50} , 58,3%; 75% e 67 % dos peixes, respectivamente, diminuíram a atividade natatória (Figura 14).

As tabelas 3, 4 e 5 mostram os parâmetros físicos e químicos das amostras coletadas durante o experimento. As concentrações de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, embora subletais, levaram à mudanças bruscas no pH do meio. Formaldeído, que ao entrar em contato com água tende a diminuir a concentração de oxigênio dissolvido, não alterou o O.D.⁵⁷. Os níveis de oxigênio foram satisfatórios, ficaram acima de 4mg/L, sofrendo pouca alteração entre o início e fim dos experimentos.

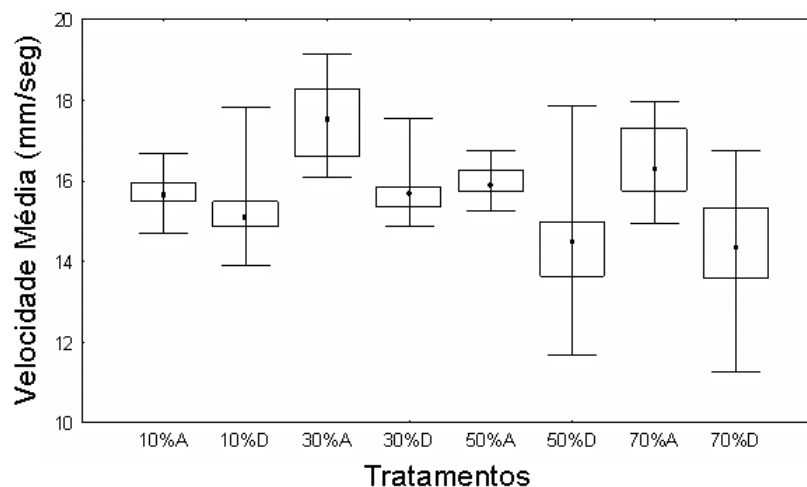


Figura 13 – Distribuição dos valores (máximo, mínimo, mediana e intervalo de 50% dos valores) da velocidade média em (mm/seg) dos grupos tratados com hidróxido de sódio antes e depois da introdução da substância em cada concentração testada. A – velocidade média antes da introdução da substância, D - velocidade média depois da introdução da substância.

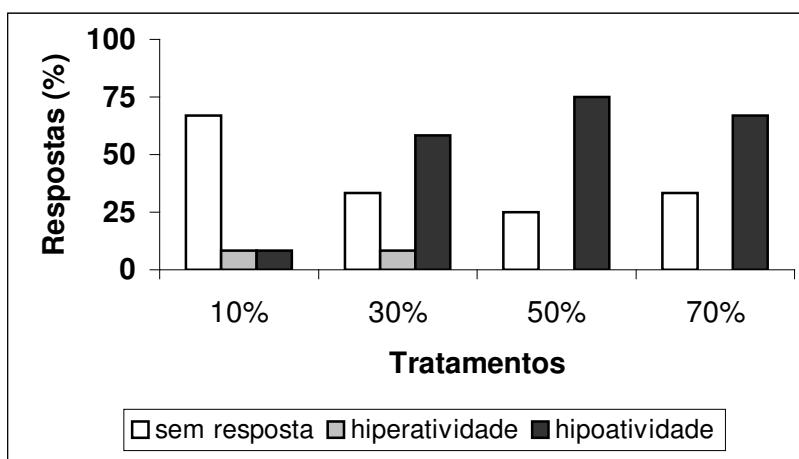


Figura 14- Percentual de respostas comportamentais para cada grupo exposto ao hidróxido de sódio.

Tabela 3 - Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao ácido sulfúrico.

	Oxigênio dissolvido (mg/L)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	6,60 – 6,81	6,07 – 6,99	6,13 – 6,34	5,60 – 6,60
Manutenção	5,86 – 6,08	5,38 – 6,41	5,36 – 5,60	5,45 – 5,87
Controle inicial	5,59 – 5,79	5,97 – 6,05	5,25 – 6,06	5,33 – 6,41
Controle final	5,42 – 5,84	5,79 – 6,84	5,29 – 6,05	5,11 – 5,97
Tratamento inicial	5,63 – 5,83	5,79 – 6,84	5,46 – 5,95	5,40 – 6,78
Tratamento final	5,44 – 5,66	5,32 – 6,02	5,44 – 5,80	5,30 – 6,19
	pH			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	6,55 – 7,12	6,92 – 6,76	6,68 – 7,10	6,24 – 7,02
Manutenção	7,02 – 7,27	7,02 – 6,78	6,98 – 7,07	6,58 – 6,87
Controle inicial	6,84 – 7,03	6,98 – 6,68	6,78 – 6,90	6,49 – 6,85
Controle final	6,65 – 6,94	7,00 – 6,65	6,50 – 6,90	6,35 – 6,66
Tratamento inicial	6,14 – 6,64	6,28 – 4,82	3,34 – 3,90	2,93 – 3,03
Tratamento final	6,30 – 6,65	6,03 – 5,49	3,34 – 3,39	2,90 – 3,00
	Temperatura (°C)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	22,4 – 23,6	23,4 – 22,7	23,1 – 25,3	23,0 – 24,4
Manutenção	24,2 – 23,8	25,0 – 24,3	23,4 – 24,9	23,9 – 25,2
Controle inicial	23,8 – 24,2	24,5 – 24,0	24,6 – 24,9	23,6 – 24,7
Controle final	24,0 – 24,6	24,6 – 23,8	24,6 – 24,7	23,7 – 25,3
Tratamento inicial	23,1 – 23,8	24,5 – 23,9	24,7 – 24,9	23,4 – 24,5
Tratamento final	23,4 – 24,6	24,7 – 24,1	24,6 – 25,3	23,8 – 25,2
	Dureza total (mg/L CaCO ₃)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	37,4 – 52,8	37,4 – 41,8		25,4 – 35,1
Manutenção	209,0 – 283,8	272,8 – 198,0		126,8 – 171,7

Tabela 4 - Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao formaldeído.

	Oxigênio dissolvido (mg/L)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	5,39 - 5,95	5,5 - 6,59	6,02 - 6,37	5,84 - 5,97
Manutenção	5,30 - 6,50	5,20 - 6,29	5,05 - 6,11	5,17 - 5,74
Controle inicial	5,08 - 5,89	5,13 - 6,65	5,07 - 5,49	5,48 - 5,89
Controle final	5,17 - 6,03	4,75 - 6,23	5,21 - 5,72	5,64 - 6,86
Tratamento inicial	5,27 - 5,87	5,08 - 6,55	5,54 - 5,96	5,41 - 6,14
Tratamento final	5,01 - 5,49	5,03 - 6,25	5,09 - 5,85	
	pH			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	6,89 - 7,00	6,80 - 6,99	6,59 - 7,10	6,72 - 6,92
Manutenção	6,85 - 7,08	6,87 - 6,99	6,63 - 7,01	6,88 - 6,92
Controle inicial	6,84 - 7,04	6,65 - 6,85	6,90 - 7,30	6,81 - 6,90
Controle final	6,89 - 7,01	6,65 - 6,82	6,73 - 7,18	6,76 - 6,95
Tratamento inicial	6,76 - 6,89	6,62 - 7,00	6,82 - 7,17	6,81 - 6,82
Tratamento final	6,89 - 6,97	6,76 - 6,82	6,55 - 7,03	6,57 - 6,75
	Temperatura (°C)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	24,7 - 26,6	25,1 - 26,2	23,3 - 24,8	23,8 - 24,7
Manutenção	25,3 - 26,4	24,4 - 26,4	24,1 - 24,6	24,5 - 25,3
Controle inicial	25,6 - 26,4	24,8 - 26,9	24,5 - 26,0	24,5 - 25,0
Controle final	24,9 - 26,4	25,5 - 26,8	24,5 - 26,0	24,5 - 25,1
Tratamento inicial	25,3 - 26,5	25,0 - 26,9	24,3 - 25,8	24,6 - 24,9
Tratamento final	25,3 - 26,5	25,5 - 26,8	24,7 - 25,3	24,3 - 25,2
	Dureza total (mg/L CaCO ₃)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	35,2 - 46,2	39,6 - 44,0	46,2 - 48,4	44,0 - 48,4
Manutenção	167,2 - 213,4	244,2 - 347,5	158,4 - 246,4	167,2 - 224,4

Tabela 5 - Parâmetros químicos e físicos das amostras de água que acompanharam o teste comportamental de exposição ao hidróxido de sódio.

	Oxigênio dissolvido (mg/L)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	6,03 – 6,42	5,17 – 6,30	5,09 – 7,37	5,54 – 6,72
Manutenção	4,70 – 7,02	5,48 – 6,84	5,51 – 6,41	5,36 – 6,83
Controle inicial	5,29 – 6,10	6,46 – 6,48	5,00 – 6,20	5,27 – 6,47
Controle final	5,71 – 6,06	5,17 – 6,72	5,07 – 6,28	5,22 – 6,45
Tratamento inicial	5,33 – 6,51	5,78 – 6,96	4,52 – 6,28	5,07 – 5,83
Tratamento final	5,38 – 6,21	5,11 – 7,44	5,16 – 5,81	5,31 – 5,78
	pH			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	6,95 – 7,20	6,57 – 7,76	6,51 – 7,20	5,96 – 7,31
Manutenção	6,82 – 7,09	6,35 – 7,01	6,41 – 7,45	5,52 – 7,25
Controle inicial	6,95 – 6,98	6,94 – 7,53	7,01 – 7,94	6,44 – 7,45
Controle final	6,96 – 7,40	6,67 – 7,77	6,64 – 7,83	5,61 – 7,38
Tratamento inicial	8,52 – 8,82	9,59 – 9,98	9,75 – 10,20	9,90 – 10,42
Tratamento final	8,65 – 8,71	9,23 – 9,48	9,52 – 10,23	10,06 – 10,38
	Temperatura (°C)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	24,0 – 25,8	24,4 – 26,0	23,3 – 26,8	24,8 – 26,0
Manutenção	24,2 – 26,4	23,5 – 26,7	23,3 – 26,9	24,8 – 26,6
Controle inicial	23,6 – 26,0	25,3 – 25,5	23,8 – 26,0	25,8 – 26,8
Controle final	22,9 – 26,0	24,9 – 26,1	24,0 – 26,2	24,5 – 26,1
Tratamento inicial	25,0 – 26,8	25,4 – 25,9	23,8 – 26,0	25,5 – 26,3
Tratamento final	25,6 – 26,0	25,2 – 26,0	23,9 – 26,1	24,6 – 26,1
	Dureza total (mg/L CaCO₃)			
	10%	30%	50%	70%
Diluição	48,4 – 50,6	32,8 – 39,0	25,4 – 39,0	23,4 – 50,6
Manutenção	222,2 – 275,0	215,5 – 252,4	124,8 – 272,9	44,9 – 152,2

6. DISCUSSÃO

As substâncias testadas em concentrações subletais induziram mudanças na atividade locomotora do organismo-teste em 2 horas de exposição, demonstrando que *D. rerio* é um bom biosensor na detecção de concentrações subletais. Vários estudos demonstraram a eficiência na detecção de compostos químicos por peixes através do comportamento, salientando a velocidade de resposta a exposições subletais. *Oncorhynchus mykiss* respondeu a vários poluentes em 40 min para 10-25% da CL_{50} ⁵⁸, em 1h para compostos orgânicos e para concentrações menores que 50% da $CL_{50}(96h)$ ⁵⁹. *Carassius auratus* respondeu com aumento da atividade natatória em 4h de exposição a carbofuranos⁶⁰ e *Apteronoutus albitrons* detectou concentrações de 44 e 69,6 $\mu g/L$ de KCN em 17 e 6 minutos, respectivamente⁵⁶.

Esses estudos evidenciam a importância do desenvolvimento de biomonitores para melhor avaliar o potencial efeito de contaminantes no ambiente, pois a informação é gerada rapidamente comparada a outros testes de sensibilidade toxicológica, tais como: os agudos, que só irão determinar concentrações letais entre 24 a 96h de exposição; os crônicos, que só dão respostas em longo prazo (ex. crescimento e reprodução); o uso de biomarcadores, que só é possível após um período relativamente longo de exposição, entre outros. No contraste às análises físico-químicas, os biomonitores facilitam uma indicação inespecífica dos poluentes, incluindo efeitos sinérgicos e antagonistas, na monitoração da água.

Dentre as diferentes respostas comportamentais, a atividade natatória é importante, pois é um indicador que integra o status interno do animal. O uso da locomoção na ecotoxicologia comportamental é baseado no fato de que ela é objetiva e quantitativa e pode ser medida efetivamente em várias espécies de peixe para caracterizar as consequências de exposições subletais⁶¹. Baseado no critério de Rand⁶² para selecionar indicadores comportamentais para estudos de toxicidade, entende-se que a atividade natatória é possivelmente mais adequada para medir o comportamento de natação para uso na rotina de estudos de toxicidade. Ela é altamente sensível, apropriada para numerosas espécies aquáticas, relevante para a sobrevivência e fácil de medir.

As exposições subletais neste estudo levaram ao aumento da velocidade média, hiperatividade, ou diminuição da mesma, hipoatividade. Estas respostas são estratégias usadas pelos organismos para resistir às exposições químicas. Podem ser classificadas dentro de duas categorias gerais de resposta: escape e adaptação.

O aumento da atividade locomotora é considerado como uma resposta de escape. Se a substância não causa intoxicação, mas é irritante, o organismo tenta fugir do local contaminado⁶³. Kane⁶⁴ verificou que a exposição do peixe *Fundulus heteroclitus* à concentrações subletais do anestésico MS222 resultou em aumento da velocidade e da porcentagem de movimento. Respostas de escape foram observadas a 1:3000 da CL₅₀ em efluentes de indústria de metais contaminados com Ni e Cr⁶⁵ e em concentrações de 0.1-5% da CL₅₀ para várias substâncias⁶¹.

O aumento da atividade locomotora pode levar ao aumento da taxa respiratória, ou seja, o peixe filtra mais água pelas brânquias para atingir a demanda de oxigênio. Desta forma, se uma maior quantidade de água contaminada passa pelas guelras, maior a oferta e a absorção da substância, levando à intoxicação e causando a diminuição da atividade com o passar do tempo.

A diminuição da motilidade pode ser explicada como um comportamento de adaptação ao estresse tóxico devido a uma possível realocação de energia, aumentando a demanda energética para outros processos fisiológicos, resultando em menos energia para locomoção⁶⁸. Esses outros processos fisiológicos podem ser de osmo e ionregulação, de indução de proteínas de estresse ou de aumento de *turnover* de energia⁶⁷. Um estudo com *Oncorhynchus mykiss* relatou a redução da atividade natatória após 96h de exposição subletal ao clordane, pentaclorofenol e um a organofosforado, sss-tributil fosforotritioato (DEF), sendo que esta resposta foi sensível a 5-50% dos valores da CL₅₀⁶⁸. *Daphnia magna* sobre estresse de cobre apresenta diminuição da velocidade média e tempo de participação natatória¹⁰.

Entretanto, as respostas comportamentais não podem ser diretamente relacionadas às concentrações tóxicas, sendo hiperatividade mais freqüente em concentrações mais baixas, como observado neste trabalho com 10% da CL₅₀ do CH₂O, e hipoatividade, comumente, em mais altas como em 50 e 70% da CL₅₀ de H₂SO₄, 30% da CL₅₀ de CH₂O

e 30, 50 e 70% da CL_{50} de NaOH. Similarmente a esse estudo, peixes expostos ao DEF ou 2,4 – DMA (2,4- ciclorofenoxiacetato) a 0,5% da CL_{50} tiveram a capacidade natatória intensificada, enquanto concentrações maiores (5-50% da CL_{50}) reduziram significativamente a capacidade natatória⁶⁸. Uma exposição subletal por 30 dias do peixe-guelra-azul (*Lepomis macrochirus*) a baixas concentrações de fluorene (0,12-0,25 mg/L) aumentou significativamente a capacidade natatória, ao passo que uma exposição a um aumento da concentração (1,0 mg/L) diminuiu significativamente a capacidade natatória⁶⁹. A performance de natação do peixe truta-arco-íris exposto a compostos orgânicos aumentou em baixas concentrações e diminuiu em altas concentrações⁷⁰.

Classificando as respostas em ordem de magnitude e considerando a variabilidade e a sensibilidade individual dos peixes, a primeira resposta seria de escape. Os peixes que sofreram irritação, respondendo de forma hiperativa, seriam peixes com baixa sensibilidade, e aqueles que responderam com diminuição da velocidade média, seriam mais sensíveis. Embora a classificação dos grupos tratados indique um único tipo de resposta (indiferença ou hipoativa ou hiperatividade) frente à exposição, na avaliação individual podemos perceber que há uma distribuição variável dessas respostas.

Desta forma, fez-se necessária a avaliação individual, pois, como foi mostrado nos resultados, muitas respostas expressas pelo grupo não representam nem mesmo o maior percentual de resposta individual. Por exemplo: o formaldeído, que a 10% da CL_{50} revelou hipoatividade para o grupo, quando essa resposta só representa 25% dos peixes e, na verdade, a maior resposta foi de hiperatividade representada por 50% dos peixes, ainda a respeito do formaldeído, na concentração de 50% da CL_{50} , que poderíamos considerar como não causativa de efeito para o grupo, a estatística individual revelou que 55% de peixes tiveram alteração na velocidade média contra 45% sem efeito. Baseada nas respostas individuais, todas as concentrações testadas de formaldeído causaram efeito significativo nos grupos tratados (com exceção da concentração de 70% da CL_{50}), visto que mais de 50% dos peixes responderam, segundo o teste de *Wilcoxon*.

A avaliação individual também mostrou uma tendência à diminuição das respostas de hiperatividade seguida ao crescimento de respostas hipoativas conforme o aumento da concentração. No ácido sulfúrico e no hidróxido de sódio esta tendência foi bem

expressiva, chegando a um percentual de hiperatividade zero nas concentrações de 50% e 70% da CL₅₀ para o NaOH, acompanhada de mais que 65% de hipoatividade.

No estudo de Ellgard⁷¹, todas as concentrações utilizadas de cromo e zinco levaram ao aumento da atividade locomotora de *Lepomis macrochirus* conforme era aumentada a concentração, enquanto que com cádmio a atividade locomotora teve grande diminuição na concentração mais alta e um aumento gradual nas concentrações mais baixas. Esse fato foi explicado como sendo um sinal de aproximação com o limite de tolerância ou limiar (“threshold”) do poluente, ou seja, a partir dessa concentração a substância passa a ser tóxica.

Baseado nesse estudo, a concentração de 10% da CL₅₀ do formaldeído foi considerada como limítrofe para a toxicidade dessa substância sob as condições estudadas. Essa concentração não seria considerada como causativa de efeito adverso, mas poderia ser utilizada para determinar o grau de detecção da espécie biosensora exposta a um agente tóxico em um determinado período de tempo.

A concentração de 10 e 30% da CL₅₀ do ácido sulfúrico e 10% da CL₅₀ do hidróxido de sódio foram consideradas como CEANO (Concentração de Efeito Adverso Não Observado) ou do inglês NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), pois não causaram alteração significativa no comportamento do peixe. Consideramos como concentrações de efeito adverso aquelas que levaram a diminuição da velocidade média, sendo elas, 50 e 70% da CL₅₀ do ácido sulfúrico, 30% da CL₅₀ do formaldeído e 30, 50 e 70% da CL₅₀ do hidróxido de sódio.

Embora a concentração de 70% da CL₅₀ do formaldeído se encaixe no perfil de hiperatividade, considerando as outras respostas em concentrações inferiores, não é descartável que o seu efeito seja adverso. As respostas expressas por este grupo são inesperadas e uma explicação, pouco provável, é que a escolha ao acaso dos peixes, selecionou 12 peixes bastante tolerantes aos efeitos da substância. O formaldeído em peixes agride o epitélio das brânquias e diminui a concentração de oxigênio dissolvido na água⁵⁷.

A alteração no comportamento é um alerta para o tipo de dano ou estresse causado por uma substância e esse estresse causará a redução ou aumento do metabolismo.

Segundo Olla⁷² e Schreck⁷³, quando um animal é exposto a uma perturbação, a primeira resposta de defesa é comportamental, na maioria das vezes um comportamento de fuga, desenvolvido para diminuir a probabilidade de morte ou economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica.

A redução da atividade pode ser uma estratégia eficaz se a exposição tem natureza temporária e a energia economizada para a mitigação do processo tóxico, por exemplo a produção de enzimas de detoxificação, é suficiente para suprir esse período. No entanto, uma atividade reduzida por um longo período de exposição pode causar danos na performance (ex. redução do hábito alimentar e de cópula) e pode levar a um colapso metabólico no organismo⁷⁴. Como a natação é um aspecto central para a biologia dos peixes, sua redução seguida da exposição a contaminantes pode até mesmo diminuir a aptidão em indivíduos afetados e ter implicações conseqüentes para as interações inter- e intraespecíficas⁷⁵.

A avaliação do potencial tóxico dessas substâncias foi importante não só pela sua alta concentração em efluentes têxteis, mas por duas delas representarem um ácido e uma base, gerando a possibilidade de avaliar o grau de irritação e tolerância a pH's extremos no comportamento de *D. rerio*, bem como a sua capacidade de detecção. Entretanto não se pode afirmar que o comportamento aqui descrito causado pela exposição subletal ao hidróxido de sódio e ao ácido sulfúrico foi apenas uma resposta de irritação em relação a mudança de pH, pois a possibilidade da toxicidade dessas substâncias não pode ser descartada. Em um estudo do efeito do pH na sobrevivência de larvas de *D. rerio*, a solução teste de pH 7.0, preparada a partir de tampão com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, foi tóxica para 24h de exposição comparada ao controle de mesmo pH, porém com água pura⁷⁶.

Estudos anteriores sobre o efeito do pH estabeleceram que o pH entre 5 e 9 não causa letalidade a peixes⁷⁷, no entanto, antes de causar a morte muitas alterações comportamentais e fisiológicas podem acontecer que impedirão o organismo exposto a cumprir o seu papel ecológico. De acordo com Little & Finger⁸, a conseqüência ecológica de um comportamento de natação anormal está implícita principalmente na alteração de comportamentos adaptativos, tais como migração, predação ou sucesso do predador,

hipoatividade e hiperatividade, bem como nos desvios na ritmicidade adaptativa diurna, que podem interromper a alimentação e aumentar a vulnerabilidade à predação.

Embora peixes tenham facilidade em locomover-se e fugir de contaminação, comparado a outros organismos aquáticos, um estudo realizado na Inglaterra com o peixe da espécie *Perca fluviatilis* relatou seu comportamento em seu ambiente natural (Lago Slapton Ley) onde sazonalmente há aumento do pH de 9,00 a 10,54 e floração de cianobactérias devido a eutrofização, ao invés de procurar outro ambiente, eles continuavam no mesmo trecho sofrendo os efeitos estressores e tóxicos⁷⁸.

No presente estudo, a concentração de 10% da CL₅₀ do H₂SO₄ diminuiu o pH para 6,5 não causando alteração no comportamento do *Danio rerio*, na concentração seguinte o pH de 5,8 causou hiperatividade em 33,3% dos peixes e 33,3% de hipoatividade. Um estudo de exposição contínua a níveis subletais de ácido relatou que pH 5,0 foi suficientemente estressante a ponto de causar hiperatividade e distúrbios na atividade periódica diária do peixe *Fundulus grandis*. Em *Oncorhynchus mykiss*, no mesmo pH, a velocidade de natação reduziu 67% em relação ao pH 7,0⁷⁹. Em *Salvelinus fontinalis*, a redução da atividade de natação deu-se em pH 5,5 seguida de redução da atividade alimentar e agressividade⁸⁰.

Alguns estudos alertam para danos na ecologia de peixes expostos cronicamente a pH's extremos. A atividade e a atração por um extrato de alimento do peixe *Salvelinus alpinus*, foi avaliada após exposições a diversos pH's. O grupo exposto a pH 5,5 não foi significativamente diferente do controle, os expostos a pH 5,0 foram um pouco mais ativos que o controle e menos atraídos pelo alimento. Nos expostos a pH 4,75 e 4,5, a atividade foi reduzida drasticamente, além de perda da atração pelo alimento, sendo a privação alimentar mais comum em condições de hipoatividade do que hiperatividade⁸¹. Portanto, durante períodos de estresse considerável, o comportamento alimentar parece perder prioridade⁸¹. A frequência de desova de várias espécies de peixe diminuiu em condições crônicas de acidez⁸² e a resposta olfativa é anulada⁸¹.

Em termos fisiológicos, a exposição crônica de peixes a ácidos causa inibição, ou pelo menos modifica, a orientação de fatores quimiosensórios em geral. Isso ocorre porque a estrutura e a forma de moléculas como os aminoácidos variam com o pH. Em

conseqüência disso, a sua transformação em outras substâncias, depende das suas curvas de pH's específicas, sendo mais estimuladas em determinados pH's do que em outros⁸³. Tecidos superficiais, do qual o epitélio é uma parte, são especialmente suscetíveis a danos causados por pH ácido^{84,85}. Além disso, ocorre a diminuição da demanda de oxigênio para os tecidos em meio com pH 4,0⁸⁶.

Comparando o efeito do pH das duas substâncias testadas e as respostas produzidas, pode-se concluir que o estresse alcalino é mais irritante ou *Danio rerio* é mais suscetível a pH's básicos do que a ácidos, visto que o NaOH causou maior percentual de respostas de hipoatividade, nas concentrações mais altas (50% e 70% da CL₅₀) esse estresse foi tão marcado que o percentual de hiperatividade foi de zero, ou seja, todos os peixes que responderam, o fizeram através da diminuição da atividade natatória. Como foi destacado na introdução, essa substância é a auxiliar mais utilizada na indústria têxtil fazendo parte de 12% do efluente final, perdendo apenas para 14% de cloreto de sódio e gomas⁸⁷.

Os valores médios de pH medido ao longo de 1995 nos efluentes gerados em diversas indústrias têxteis de Santa Catarina variaram de 7,2 a 11,7⁸⁷. Em outro estudo, realizado no município de Estância no Rio Piauitinga na bacia hidrográfica do rio Piauí, a coleta de efluente têxtil diretamente do cano de lançamento para o corpo d'água receptor indicou pH de 12,56⁸⁸, valores superiores aos pH's aqui testados. Vale lembrar que a legislação responsável pelos padrões de lançamento de efluentes, Resolução CONAMA 20/86, vigente no período desses estudos, estabelece que efluentes só poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que o pH esteja entre 5,0 e 9,0. A legislação vigente, Resolução CONAMA 357/05, acrescenta à anterior dizendo que o efluente não deverá causar, ou possuir potencial para causar, efeitos tóxicos crônicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Mesmo que esses pH's não causem letalidade aguda, pode-se observar alterações comportamentais severas e efeitos crônicos, que podem levar a morte.

A exposição crônica à água alcalina causa inibição imediata e drástica da excreção de amônia e subseqüentemente aumento da amônia no plasma, que pode ser potencialmente letal^{89,90,91,92,93,94,95,96}. A inibição da excreção de amônia é atribuída à

interrupção do seu gradiente, devido à redução de íons H^+ disponíveis para transformar NH_3 em NH_4^+ ⁹⁷.

Esses dados revelam a fragilidade do sistema de fiscalização bem como a suscetibilidade dos ambientes aquáticos à cargas poluidoras. Essa fragilidade dá-se pela falta de recursos humanos e técnicas de avaliação confiáveis, de fácil manuseio e de baixo custo. No cenário atual, seria conveniente a implantação de técnicas de biomonitoramento em tempo real utilizando o comportamento de organismos aquáticos como biosensores de possíveis efeitos tóxicos.

A ecotoxicologia é uma área ainda pouco explorada no Brasil e, além disso, nossas leis ambientais ainda estão em andamento. O controle da toxicidade de resíduos lançados no ambiente é de suma importância para a saúde do ecossistema e do homem. Através das análises de indicadores comportamentais sensíveis e apropriados, espera-se que, no futuro, as substâncias lançadas no ambiente sejam minimizadas a níveis que protejam a viabilidade dos seres vivos. Não apenas seu envolvimento com a mortalidade, mas também prevenindo alterações no comportamento e garantindo a estrutura das populações de peixes e das comunidades aquáticas.

A avaliação da atividade natatória é útil na definição das concentrações consideradas como sem efeito nos testes agudos em laboratório ou sob condições controladas de campo. Contudo, de acordo com outros indicadores toxicológicos, a extrapolação das respostas comportamentais para efeitos que podem ocorrer em populações naturais é difícil de interpretar. Embora seja de difícil avaliação, esses estudos demonstram melhor a realidade do ambiente do que os teste de exposição aguda e pode ser usado como um indicador de toxicidade subletal válido e consistente que pode ser facilmente incorporado em protocolos para avaliar a sensibilidade dos testes de toxicidade padrão⁸.

7. CONCLUSÕES

- O organismo biosensor foi capaz de refletir alterações comportamentais induzidas por concentrações subletais.
- A análise individual é mais confiável para avaliação das respostas e, dessa forma, caracterizar os efeitos sofridos pelo organismo biosensor.
- O hidróxido de sódio causou mais estresse ao comportamento de *D. rerio* comparado às demais substâncias, embora pelo teste de toxicidade aguda tenha sido o menos tóxico.
- *Danio rerio* tende a responder em concentrações baixas através de hiperatividade e em altas, com hipoatividade;
- Os resultados obtidos vêm demonstrando que o sistema de análise de imagem em tempo real em laboratório torna-se uma alternativa eficiente para avaliação toxicológica, pois é capaz de detectar alterações comportamentais induzidas por concentrações que não causam mortalidade, porém que possam ter implicações ecológicas para as populações aquáticas.
- É um método não-invasivo, prático, bastante sensível, apropriado para pesquisas ecotoxicológicas e para uma gama de aplicações, tendo a vantagem de: a) ter sensibilidade elevada comparável com outros testes toxicológicos; b) ter a capacidade de monitorar de forma automática sem causar perturbação ao organismo-teste; c) os organismos respondem com mudanças comportamentais dentro de curtos períodos de tempo.
- O método do biomonitoramento em tempo real utilizando a atividade locomotora de organismos aquáticos como indicador de toxicidade em 2h, a partir de valores

estimado da CL_{50} , poderá futuramente ser utilizado complementarmente aos testes de toxicidade aguda e no controle da qualidade de efluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bassoi LJ, Guazelli MR. Controle Ambiental da água. In: Philippi JrA, Roméro MA, Bruna GC (organizadores). Curso de Gestão Ambiental. Coleção ambiental. Barueri, São Paulo: Editora Manole; 2004. p.53-101.
2. Tundisi JG. Água no século XXI: Enfrentando a escassez. São Carlos: Rima; 2003.
3. Gherardi-Goldstein E, Zagatto PA, Araujo RP, Bertoletti E . Avaliação da Toxicidade dos Principais Despejos Industriais da Região de E.R.Q. - Suzano, Através de Ensaio Biológicos. Revista DAE, 1983; 43 (132): 42-7.
4. Lima JS. O Biomonitoramento como ferramenta complementar na avaliação de impactos ambientais - Discutindo Conceitos. Belo Horizonte: Techoje, 2000. <http://www.techoje.com.br> (acesso em 03/Jul/ 2001).
5. Azevedo FA, Chasin AAM. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. São Paulo, São Carlos: Editora Rima; 2003.
6. Jensen A, Bro-Ramussen F. Environmental cadmium in Europe. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1992; 125:101-81.
7. Cabrera C., Ortega E, Lorenzo ML, López MDC. Cadmium Contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. Rev Environ Contam Toxicol 1998; 154: 55-81.
8. Little EE, Finger SE. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environ Toxicol Chem 1990; 9: 13-9.
9. Shedd TR, Van Der Schalie WH, Widder MW, Burton DT. Long-Term Operation of an Automated Fish Biomonitoring System for Continuous Effluent Acute Toxicity Surveillance. Bull Environ Contam Toxicol 2001; 66: 392-9.
10. Untersteiner H, Kahapka J, Kaiser H. Behavioral response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal copper stress - validation by image analysis. Aquat Toxicol 2003; 65:435-42.

11. BBE. Biological Biophysical Engineering. <http://www.bbe-moldaenke.de/home.html> (acessado em 15/Dez/2004).
12. Marcucella H, Abramson CI. Behavioral toxicology and teleost fish. In: Mostofsky DJ, editor. *The Behavior of fish and other Aquatic Animals*. London, UK: Academic Press; 1978 p. 33-77.
13. Gouveia JrA, Maximino C, Brito TM. Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências. Faculdade de Ciências/UNESP. São Paulo, Bauru 2006. <http://www.fesbe.org.br/fesbenovo/fesbe2006/files/cursopeixesneuro.pdf> (acessado em 07/Nov/2006).
14. Thorndike EL. A note on the psychology of fishes. *American Naturalist*, 1911: XXXIII, 396. <http://psychclassics.yorku.ca/Thorndike/Animal/fish.htm#f1> (acessado em 10/Jul/2006).
15. Lorenz, K. *Ele Falava com os Mamíferos, as Aves e os Peixes*. Lisboa: Publicações Europa América; 1983.
16. Grue CE, Gardner SC, Gibert PL. On the Significance of Pollutant-induced Alterations in the Behaviour of Fish and Wildlife. In: Dell’Omo G, editor. *Behavioural Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, LTD; 2002. p 1-90.
17. Charoy CP, Janssen CR, Persoone G, Clément P. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. the use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. *Aquat Toxicol* 1995; 32:271-82.
18. Dodson SI, Hanazato T, Gorski PR.. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carabaryl and *Chaoborus kairomone*. *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 43-50.
19. Sorensen F, Bayley M, Baatrup E. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 1587-90.
20. Tahedl H, Häder DP. Fast examination of water quality using the automatic biotest ecotox based on the movement behavior of freshwater flagellate. *Water Res* 1999; 33:426-432.

21. Tahedl H, Häder DP. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2001; 48:161-9.
22. Hader DP, Lebert M. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. *Photochem Photobiol* 1985; 42: 509-14.
23. Gualtieri P, Ghetti F, Passarelli V, Barsanti L. Microorganism Track reconstruction: an image processing approach. *Comput Biol Med* 1988; 18: 57-63.
24. Gualtieri P, Coltelli P. A digital microscope for real time detection of moving microorganism. *Micron Microsc Acta* 1989; 20: 99-105.
25. Passarelli L, Gualtieri P. A Simple device for Ultramicroscopic studies of mobile microorganisms. *Micron Microsc Acta* 1990; 21: 101-4.
26. Van Hoof R, Sluyts H, Paulussen J, Berckmans D, Bloemen H. Evaluation of a biomonitor based on the phototactic behaviour of *Daphnia magna* using infrared detection and digital image processing. *Water Sci Technol* 1994; 30: 79-86.
27. Baillieul M, Scheunders P. On-line determination of the velocity of simultaneously moving organisms by image analysis for the detection of sublethal toxicity. *Water Res* 1998; 32: 1027-34.
28. USACEHR. U.S. Army Center for Environmental Health Research, located at Fort Detrick, Maryland, USA. <http://usacehr.detrick.army.mil> (acessado em 08/Ago/2004).
29. EMPACT – Environment monitoring for public assess and community tracking . <http://aquaticpath.umd.edu/empact> (acessado em 10/Ago/2006).
30. UNT - University of North Texas' Little Miami River Clam Biomonitoring. Aquatic Toxicology Laboratory's Little Miami River Biomonitor Page http://www.hist.unt.edu/~jallen/littlemiami/Clam_Page.html (acessado em 12/Set/2005).
31. Gruber D, Diamond JM, editors. Automated biomonitoring – living sensors as environmental monitors London: Ellis Horwood ltd; 1988.

32. Rosemberg DM, Resh VH. Introduction to Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. In: Rosemberg DR, Resh VH, editors. Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. New York, London; 1993. p.1-9.
33. Gunatilaka A, Diehl P. A Brief Review of Chemical and Biological Continuous Monitoring of Rivers in Europe and Asia. In: Butterworth, Gunatilaka, Gonsebatt, editors. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change, Volume II. New York, Plenum Press; 2000. p 9-28.
34. Real Time Biomonitoring for environmental control and drinking water protection
Extract from the presentation at *NWQMC National Monitoring Conference* ,
Madison / Wisconsin
http://www.consulat.com.br/pdf/bbe/Toxicidade/Publications/Real_Time_Biomonitoring_for_environmental_control.pdf. (acessado em 04/Jul/2006).
35. Sanin LBB. Tecnologia e meio ambiente. Associação Brasileira de Químicos e Coloristas Têxteis 1996; 4: 13-14.
36. Chang CN, Yu RF, Chao AC, TOJO S. On-line monitoring and control of textile wastewater color removal process. *Water Sci Technol* 1994; 30: 265-74.
37. Wang C, Yediler F, Kiefer Z, Kettrup A. Comparative studies on acute toxicities of auxiliary chemicals used in textile finishing industry by bioluminescence test and neutral red test. *Bull Environ Contam Toxicol* 2002; 68:478-84.
38. Oliveira ACM et. al..Matérias Primas e Insumos Industriais: situação atual e perspectivas. Rio de Janeiro. Confederação das Indústrias, 1980.
39. BNDES, CNI, SEBRAE. Qualidade e Produtividade na Indústria Brasileira. Rio de Janeiro, 1996.
40. Sewekow U. How to meet the requirements for eco-textiles. *Tex Chem Color* 1996; Jan: 20 - 7.
41. Guerreiro L. Resposta Técnica produzida pelo Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas / SBRT. REDETEC - Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro.
<http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt2971.pdf?PHPSESSID=77b58485fd068d47be675ba088604e64> (acessado em 08/Jun/2006).

42. _____. Roteiro complementar de licenciamento e fiscalização para tipologia têxtil. Recife: CPRH/GTZ, 2001.
43. ATSDR – Agency for Toxic Substance & Disease Registry. Toxicological Profile for Sulfur Trioxide and Sulfuric Acid. U.S. Department Of Health And Human Services. Public Health Service; 1998.
44. WHO. World Health Organization. Formaldehyde: Environmental health criteria. Geneva: World Health Organization; 1989
45. Macedo JC. Ecologia e Produtividade na Estamparia com Pigmentos: Fixadores isentos de Formaldeído. Sintequímica. Textos Técnicos. <http://www.sintequimica.com.br> (acessado em 02/Out/2006).
46. ATSDR – Agency for Toxic Substance & Disease Registry. Toxicological Profile for Formaldehyde. U.S. Department Of Health And Human Services. Public Health Service; 1999.
47. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Formol ou Formaldeído. Brasil. <http://www.inca.gov.br> (acessado em 02/Out/2006).
48. ATSDR – Agency for Toxic Substance & Disease Registry. Medical Management Guidelines for Sodium Hydroxide (NaOH). <http://www.atsdr.cdc.gov> (acessado em 02/out/2006).
49. EPA – Environmental Protect Agency. Green Chemistry. BioPreparation™ of Cotton Textiles: A Cost-Effective, Environmentally Compatible Preparation Process. United State. <http://www.epa.gov/greenchemistry> (acessado em 02/Out/2006).
50. Cairns J Jr, Mount DJ. Aquatic Toxicology. Environ Sci Technol 1990; 24(2): 154-61
51. Talwar PK, Jhingran AG. Inland fishes of india and adjacent countries. in 2 vols. New Delhi, Bombay, Calcutta: Oxford & Ibh publishing co, 1991.
52. Knie JLW, Lopes EWB. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004; 289p.
53. Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, *et al.* N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. Development 2003; 130(11):2479-94.

54. CETESB, São Paulo. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. 1990; p 1-7.
55. Van Der Schalie WH, Shedd TR, Knechtges PL, Widder MW. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosens Bioelectron* 2001; 16:457-65.
56. Thomas M, Florion A, Chretien D, Terver D. Real-time biomonitoring of water contamination by cyanide based on analysis of the continuous electric signal emitted by a tropical fish: *apteronotus albifrons*. *Water Res* 1996; 30: 3083-91.
57. Martins ML. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: Ranzani-Paiva MJ, Takemoto RM, Lizama MAP, organizadores. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela; 2004 p. 357-70.
58. Baldwin IG, Harman MMI, Neville DD. Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances. I: laboratory trials. *Water Res* 1994; 28: 2191-9.
59. Kaiser KLE, McKimon MBM, Standahl DH, Pett WB. Response threshold levels of selected organic compounds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 2107-13.
60. Saglio P, Trijasse S, Azam D. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996; 31:232-8.
61. Little EE, Fairchild JF, De Lonay AJ. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. *American Fisheries Society Symposium* 1993; 14: 67-76.
62. Rand GM. The use of behavioral measurements to assess toxicant induced stress in marine organisms. In: Persoon G, Jaspers E, Claus, editors. *Ecotoxicological testing for marine Environment Vol.2*. Institute for marine Scientific Research. Bredene, Belgium; 1984. p. 355-431.
63. Smith EH, Bailey HC. Development of a system for continuous biomonitoring of a domestic water source for early warning of contaminants. In: Gruber DS, Diamonds JM, editors. *Automated Biomonitoring: Living sensors as Environmental monitors*. Chichester, U.K: Ellis Horwood; 1984. p.182-205.

64. Kane AS, Salierno JD, Gipson GT, Molteno TCA, Hunter C. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress response of fish. *Water Res* 2004; 38:3993-4001.
65. Hadjinicolaou J, Spraggs LD. Avoidance reaction of fish to an industrial effluent and its constituent toxic components. In: Gruber D, Diamond J, editors. *Automated biomonitoring: living sensors as environmental monitors*. Chichester, UK. Ellis Horwood; 1988. p 104 - 27.
66. Gerhardt A. Whole Effluent Toxicity Testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): Survival and Behavioral Responses to a Dilution Series of a Mining Effluent in South Africa. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998; 35: 309-316.
67. Triebkorn KW, Köler HR, Honnen W, Schramm M, Adams SM, Müller EF. Induction of heat shock proteins, changes in liver structure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J Aquat Ecosystem Stress and Recovery* 1997; 6: 57-73.
68. Little EE, Archeski RD, Flerox BA. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990; 19: 380-385.
69. Finger SE, Little EE, Henry MG, Fairchild JF, Boyle TP. Comparison of laboratory and field assessment of fluorine, part I: Effects of fluorine on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. In: Boyle TP, editor. *Validation and Predictability of laboratory methods for assessment the fate and effects of contaminants in aquatic ecosystems*. STP 865. American Society for Testing and materials. Philadelphia, PA; 1985. p 120-33
70. Beitinger TL, McCauley RW. Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes. *J. Great Lakes Res* 1990; 16: 542-75.
71. Ellgaard EG, Tusa JE, Malizia Jr. AA. Locomotor activity of bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. *J Fish Biol* 1978; 1:19-23.
72. Olla BL, Pearson WH, Studholme AL. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. *Rapp P-V Réun-Cons Int Explor Mer* 1980; 179: 162-73.

73. Schreck CB, Olla BL, Davis MW. Behavioral response to stress. In: Iwama GK, Pickering, AAD, Sumpter JP, Schreck CB, editors. Fish stress and Health in Aquaculture. Cambridge Univ. Press, Cambridge; 1997. p. 145-170.
74. Baganz D. Comparing locomotor behaviour of fish species *Danio rerio* and *Leucaspis delineatus* under the influence of Chemical stressors [tese de doutorado]. Berlin: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, der Humboldt-Universität zu Berlin; 2005.
75. Hopkins WA, Snodgrass JW, Staub BP, Jackson BP, Congdon JD. Altered Swimming Performance of a Benthic Fish (*Erimyzon sucetta*) Exposed to Contaminated Sediments Arch Environ Contam Toxicol 2003; 44: 383-9.
76. Dave G. Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Bull Environ Contam Toxicol. 1984; 33: 621-30.
77. Alabaster JS, Lloyd R, editors. Water Quality Criteria for freshwater fish. London : Ed., Butterworth Scientific; 1982.
78. Scott DM, Lucas MC, Wilson RW. The effect of high pH on ion balance, nitrogen excretion and behaviour in freshwater fish from an eutrophic lake: a laboratory and field study. Aquat Toxicol 2005; 73: 31-43.
79. Ye X, Randall DJ. The effect of water pH on swimming performance in rainbow trout (*salmo gairdneri*, Richardson). Fish Physiol Biochem 1991; 9: 15-21.
80. Hunn JB, Cleveland L, Little EE. Influence of pH and aluminum on developing brook trout in low calcium water. Environ. Pollut 1987; 15:1-26.
81. Jones KA, Hara TJ, Scherer E. Behavioral modifications in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) chronically exposed to sublethal pH . Physiol Zool 1985; 58: 400-12.
82. Craig GR, Baski WF. The effect of depressed pH on flagfish reproduction, growth and survival. Water Res 1977; 11: 621- 6.
83. Hara TJ. Effects of pH on the olfactory responses to amino acids in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp Biochem Physiol A 1976; 54: 37-9.

84. Daye PG, Garside ET. Histopathologic changes in surficial tissues of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), exposed to acute and chronic levels of pH. *Can J Zool* 1976; 54: 2140 – 55.
85. Daye PG, Garside ET. Structural alterations in embryos and alevins of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by continuous or short-term exposure acidic levels of pH. *Can J Zool* 1980; 58:27-43.
86. Neville CM. Sublethal effects of environmental acidification on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Res Board Can* 1979; 36: 84-7.
87. Martins GBH. Práticas limpas aplicadas às Indústrias têxteis de Santa Catarina [Dissertação de mestrado]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 1997.
88. Andrade RCB, Souza MFL, Couto ECG. Influência de efluentes têxteis e alimentícios sobre o metabolismo e propriedades físicas e químicas do rio Piauitinga (Sergipe). *Quím Nova* 1998; 21(4): 429-427.
89. Wright PA, Wood CM. An analysis of branchial ammonia excretion in the fresh water rainbow trout—effects of environmental pH change and sodium uptake blockade. *J Exp Biol* 1985; 114: 329–53.
90. Wilkie MP, Wood CM. Nitrogenous waste excretion, acid–base regulation, and ionoregulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to extremely alkaline water. *Physiol Zool* 1991; 64: 1069-86.
91. Wilkie MP, Wood CM. The effects of extremely alkaline water (pH 9.5) on rainbow trout gill function and morphology. *J Fish Biol* 1994; 45: 87–98.
92. Wilkie MP, Wood CM. Recovery from high pH exposure in the rainbow trout—white muscle ammonia storage, ammonia washout, and the restoration of blood chemistry. *Physiol Zool* 1995; 68: 379–401.
93. Yesaki TY, Iwama GK. Survival, acid–base regulation, ion regulation, and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water. *Physiol Zool* 1992; 65: 763–87.
94. Wilkie MP, Simmons HE, Wood CM. Physiological adaptations of rainbow trout to chronically elevated water pH (pH 9.5). *J Exp Zool* 1996; 274: 1–14.

95. Wilson JM, Iwata K, Iwama GK, Randall DJ. Inhibition of ammonia excretion and production in rainbow trout during severe alkaline exposure. *Comp Biochem Physiol* 1998; 121: 99–109.
96. Laurent P, Wilkie MP, Chevalier C, Wood CM. The effect of highly alkaline water (pH 9.5) on the morphology and morphometry of chloride cells and pavement cells in the gills of the freshwater rainbow trout: relationship to ionic transport and ammonia excretion. *Can J Zool* 2000; 78: 307–19.
97. Wright PA, Randall DJ, Perry SF. Fish gill water boundary layer—a site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion. *J Comp Physiol B* 1989; 158: 627–35.

ANEXO

ASPECTOS RELEVANTES

Embora o procedimento seja simples e tenha curta duração, gostaria de chamar atenção para algumas dificuldades que tomaram bastante tempo, mas que contribuíram para o meu aprendizado. É importante ressaltar alguns aspectos para que, futuramente, em caso de reprodução dos dados, possam ser considerados.

1. QUALIDADE DA ÁGUA DO AQUÁRIO E SAÚDE DOS PEIXES

1.1 Amônia:

A qualidade da água do aquário de manutenção é um importante fator a ser monitorado. Geralmente, aquários levam de 15 a 30 dias para estabilizarem a biota natural. Antes de começarmos este projeto o laboratório já mantinha um aquário para os peixes. Nesse aquário utilizava-se filtro de placa com pedras porosas (figura 15). Esse sistema levou 15 dias para estabilizar-se, ou seja, manter os teores de amônia a níveis indetectáveis. O teste utilizado para detecção de amônia foi o *Labcon Teste Amônia NH₃/NH₄*, que indica a concentração aproximada em 4 níveis: ideal (0,0ppm), crítico (0,25 ppm), danoso (0,75 ppm) e potencialmente letal (1,5 ppm).

O fundo coberto de pedras porosas propicia maior área para fixação das bactérias nitrificantes não havendo necessidade de introduzir peixes para proliferação das mesmas. Somente o aquário com a água parada e aerada já foi suficiente para que em 15 dias a biota depurasse a amônia. O problema desse sistema de filtração é que o alimento administrado aos peixes, que não é imediatamente ingerido, precipita e mesmo a aspiração das pedras porosas não é suficiente para a limpeza do fundo, pois muito da “sujeira” (excretas e restos de alimento) passa pelo filtro de placa e se concentra no fundo, onde a aspiração não é possível. Observou-se que os peixes estavam ficando doentes, com manchas pelo corpo, e como eram utilizados em testes de sensibilidade à substâncias químicas não era correto administrar nenhum tipo de tratamento antibiótico.

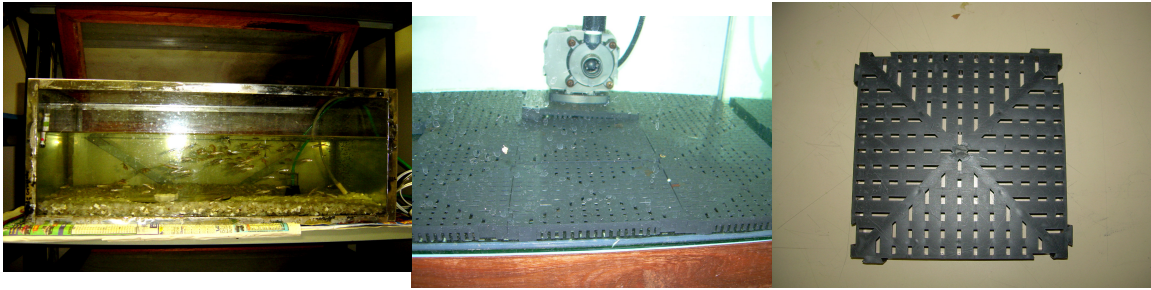


Figura 15 - (a) Aquário com filtro de placas e pedras, (b) Aquário somente com Filtro de placas, (c) filtro de placa.

Para tentar solucionar este problema, o filtro de placa foi substituído pelo filtro de espuma (Figura 16). O filtro de espuma tem uma área de contato menor para a fixação das bactérias levando mais tempo para estabilizar, necessitando que fossem colocados peixes para aumentar a colônia de bactérias e as taxas de retirada de amônia. As taxas de amônia subiram a 1,5 ppm, considerado letal para os peixes. Para minimizar estas taxas, metade da água do aquário era trocada todos os dias e a espuma do filtro era lavada três vezes na semana. Este procedimento, sem que soubéssemos, fazia com que parte das bactérias que haviam se fixado na espuma e que estavam dispersas na água fossem jogadas fora, contribuindo para que os teores de amônia permanecessem elevados. Porém, em um feriado prolongado de 5 dias, esse procedimento de troca de água e lavagem da espuma não puderam ser realizados, o que contribuiu para o aumento da colônia de bactérias e, conseqüentemente, redução dos teores de amônia para entre 0 e 0,25 ppm, porém ainda não estava zerada. Alguns testes foram feitos neste período e observou-se uma baixa atividade de natação dos peixes, ocorrendo mortalidade em concentrações subletais e até mesmo no controle. Então, foi esperado um período de 15 dias sem qualquer lavagem da espuma e troca de água, somente sifonando as sujeiras do fundo e completando o nível de água, até que a amônia atingisse teores nulos.

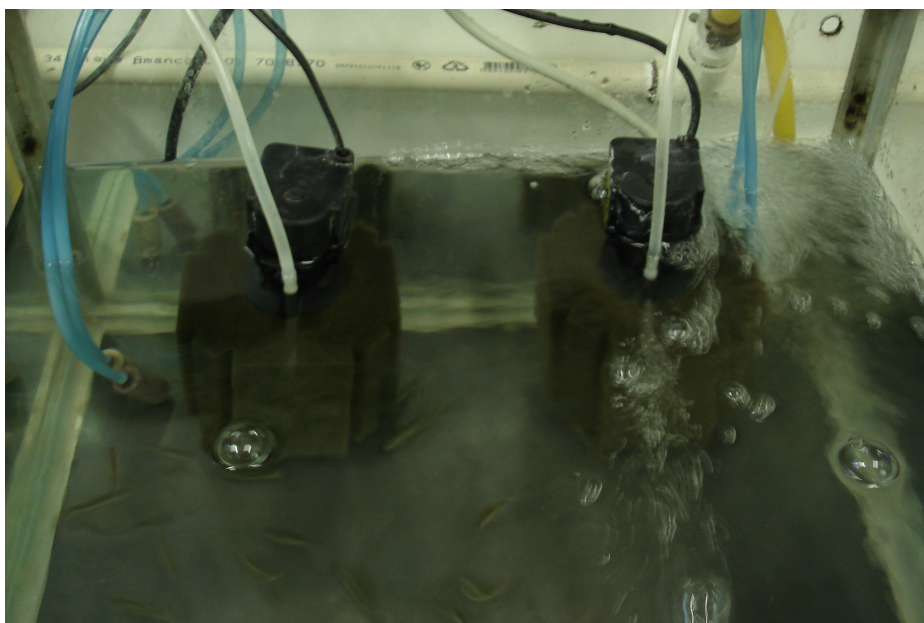


Figura 16 - Filtro de espuma.

Desta forma a concentração de amônia mostrou-se um parâmetro bastante importante de ser monitorado para qualquer experimento que utilize peixes como biosensores, sendo necessário um tempo prévio aos testes para montagem do aquário, escolha do melhor sistema de filtração e estabilização das colônias de bactérias nitrificantes. No mercado já há disponível um coquetel dessas bactérias que pode ser introduzido em aquários recém montados para agilizar esse processo e também há produtos para reduzir a amônia. Não utilizamos nenhum desses produtos, pois acreditamos que a introdução de substâncias artificiais poderia, de alguma forma, interferir nos resultados e na performance dos peixes. Preferimos perder alguns meses até que o aquário estivesse pronto.

1.2 Alimentação dos peixes

Um outro aspecto que pode influenciar nos resultados é o grau nutricional dos peixes. O fornecedor dos peixes não se localiza no município do Rio de Janeiro, dessa forma, a compra de peixe necessita de uma organização de calendário. Com isso, comprávamos lotes com cerca de 120 peixes a cada vez. Os peixes, como foi dito na metodologia, ficavam uma semana em aclimação no laboratório, conseqüentemente, alguns ficavam quase um mês em laboratório até serem usados, sendo alimentado por

ração comercial, Spirulina 200. Começamos a observar a diminuição da atividade e perda de peso destes peixes. A partir destas observações, reforçamos a alimentação com *Daphnia pulex* viva e “minhoca de sangue” congelada, alimentos ricos em gorduras e proteínas, que foram administrados três vezes por semana e, além disso, passamos a comprar lotes menores.

2. REAGENTES

Os testes agudos foram realizados utilizando reagentes que já existiam no laboratório. Como já estavam usados, estes reagentes acabaram e recomeçamos os testes comportamentais com outras marcas e lotes de reagente. Como todos eram P.A., não eram esperadas diferenças, mas começaram a ocorrer mortalidade em concentrações subletais. Os fabricantes antigos foram contactados para informações sobre as especificações do produto e compra de novos reagentes da mesma marca. Enfim, uma marca não tinha as especificações do lote, pois era muito antigo e a outra tinha parado de produzir o reagente. Conclusão, todos os testes de toxicidade aguda foram refeitos com os novos reagentes.