

Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do Cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental

Study on the acute toxicity and metabolic changes caused by cadmium exposure on the fish *Hyphessobrycon Callistus* used as an indicator of environmental health

Murilo Damato*

Edison Barbieri**

Resumo

No Brasil, *Hyphessobrycon callistus* é um importante peixe comercialmente explorado na aquariofilia, sendo um animal ideal para estudar os prejuízos causados pelos efeitos de metais pesados, os quais são detectados frequentemente no ambiente aquático. A finalidade principal deste estudo foi detectar a toxicidade aguda do Cd em *H. callistus* e investigar seus efeitos no consumo de oxigênio e na excreção da amônia. Estas informações são inéditas para esta espécie, e o tema é pouco estudado no Brasil. A toxicidade aguda do Cd para *H. callistus* em termos da concentração letal em 24h, 48h, 72h e 96h (LC50) foram de: 45.95, 32.49, 28.28, e 15.16 mg/l, respectivamente. Além disso, para peixes expostos a concentração de a 2,5 mg/l de Cd, houve uma redução do consumo do oxigênio e da excreção de amônia de 59% e 71,5%, respectivamente, em relação ao controle.

Palavras-chave: *Hyphessobrycon callistus*. Cádmio. Toxicidade. Metabolismo.

Abstract

In Brazil, *Hyphessobrycon callistus* is an important commercially exploited species and it is an ideal animal for studying damages caused by the effects of heavy metal that are often detected in the aquatic environment. The main purpose of the present study was to detect the acute toxicity of Cd to *H. callistus* and investigate its effects on oxygen consumption, ammonium excretion, and the neutral red retention time assay to estimate effects at the cellular level. Such investigations have not been carried out before with this species. Acute toxicity of Cd to *H. callistus* in 24h, 48h, 72h, and 96h medium lethal concentration (LC50) was showed to be 45.95, 32.49, 28.28, and 15.16 mg/l, respectively. Furthermore, it was found that exposure of fish to 1.5 mg/l Cd caused reduction in oxygen consumption and ammonium excretion of 59% and 71.5%, respectively as compared to controls.

Keywords: *Hyphessobrycon callistus*. Cadmium. Toxicity. Metabolism.

* Biólogo. Doutor pela POLI-USP. Mestre em Ecologia. Professor do Curso de Gestão Ambiental da PUC-SP, São Paulo, Brasil.

** Oceanógrafo com Habilitação em Oceanografia Biológica e Geológica. Doutor e Mestre em Oceanografia Biológica pela Universidade de São Paulo. Professor Doutor do Instituto de Pesca – APTA – Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Cananeia-SP, Brasil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

INTRODUÇÃO

Os metais pesados há tempos têm sido reconhecidos como contaminantes ambientais, podendo, de acordo com a concentração, provocar graves problemas de saúde pública e ambientais^{1,2,3,4,5,6,7}. No Brasil, os metais pesados entram nos ecossistemas aquáticos por descargas de efluentes industriais que são liberados direta ou indiretamente no ambiente^{6,7}. Altas concentrações de metais pesados têm sido registradas em águas costeiras^{5,8}, rios e estuários⁹, em crustáceos^{10,11} e em tecidos de vertebrados marinhos^{12,13,14}.

Cádmio é um metal altamente tóxico para organismos que vivem no ambiente aquático^{15,16,17,18}. Em águas naturais, as concentrações de cádmio são muito baixas, chegando às vezes a valores inferiores a 0,01 µg/L^{19,20}.

Alabaster e Lloyd²¹ verificaram que a temperatura tem papel fundamental na toxicidade do cádmio e que, quanto maior for a temperatura, mais acentuada será a toxicidade. Para a USEPA²², a toxicidade do cádmio (CL50,96h) para espécies de peixes de água doce varia de 1,0 a 7.940 µg/L, dependendo da espécie testada, da dureza e da temperatura da solução-teste.

O cádmio, em concentrações subletais, pode causar a natação errática em diversas espécies de peixes²³. No relatório da USEPA²⁴, encontramos dados sobre o efeito de Cd em *Notemigonus crysoleucas* no qual não verificou-se alterações significativas de comportamento quando estes foram expostos a concentrações de 68 µg/L de cádmio.

As duas maiores fontes de absorção de cádmio em peixes são: pela mucosa intestinal e pelo epitélio branquial²⁵. Segundo o autor, esse metal pode provocar alterações na terminação neuro-muscular, resultando em paralisia na musculatura respiratória e depressão no sistema respiratório. Para o autor, o cádmio pode se depositar no epitélio branquial em concentrações superiores a 150 mg/kg e causar sua necrose.

Vários autores registraram a toxicidade aguda do cádmio para espécies de peixes de água doce^{26,27,28,29,30,31,32}. Entretanto, no Brasil ainda são

incipientes os trabalhos que tratam do assunto, carecendo, assim, de dados sobre os efeitos de metais sobre a biota nativa.

Efeitos de metais pesados na taxa respiratória de organismos aquáticos já foram bem estudados^{6,7,8}. Entretanto, ainda falta muita informação dos efeitos combinados com fatores ambientais, como temperatura e dureza da água¹⁴. Além disso, existem poucos trabalhos relatando efeitos letais e subletais de metais pesados sobre os peixes brasileiros. Por essa razão, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do Cd e o efeito desse metal sobre o consumo de oxigênio e a excreção de amônia de *Hyphessobrycon callistus*.

MÉTODO

Hyphessobrycon callistus

Essa espécie foi escolhida por ser uma nativa de ampla distribuição no Estado de São Paulo, ser de fácil aquisição, disponível durante quase todo o ano e de excelente adaptação ao laboratório. Os organismos foram adquiridos de criadores, na região de Moji das Cruzes, e posteriormente aclimatados no laboratório.

Aclimação

Os animais foram aclimatados inicialmente em tanques com água bifiltrada que apresentava as seguintes características: temperatura – 22,0 ± 2 °C; pH – 6,8 ± 0,6; condutividade – 60 a 95 µS/cm; oxigênio dissolvido – 6,5 a 7,3 mg/L; alcalinidade – 22 a 34 mg/L de CaCO₃; dureza – 38 a 44,0 mg/L de CaCO₃; concentração de N-NH₃ – 0,05 a 0,65 mg/L.

Eles aí permaneceram por um período mínimo de 8 dias, sendo alimentados diariamente com ração composta de 4,1 g/kg de farinha de peixe, 5,0 g/kg de farelo, 6,0 g/kg de fubá, 4,0 g/kg de farinha de trigo, 200 g/kg de butonita, 20 g/kg de NaCl, 200 ml/kg de óleo de soja, 100 g/kg de polivolúmico e 200 g/kg de complexo mineral.

Durante esse período, os animais foram cuidadosamente observados. Em caso de registro de um comportamento anormal em parte da população, ou mesmo na ocorrência de

mortalidade de indivíduos (em porcentagens próximas a 10%), eles eram colocados em quarentena, em solução bactericida e fungicida. Persistindo a sintomatologia (letal ou subletal), o lote era descartado.

Posteriormente, os animais foram transferidos para um tanque, onde foram aclimatados em condições similares às dos testes, utilizando-se para isso a mesma água de diluição, classificada como água "mole" ("softwater"), segundo APHA³³, com a seguinte composição: NaHCO_3 – 48,0 mg/L; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 30,0 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 72\text{H}_2\text{O}$ – 30,0 mg/L; KCl – 2,0 mg/L.

Os peixes permaneceram nesse tanque por um período de 2 dias, sem alimentação, para reduzir a influência dos metabólitos nitrogenados³². Em seguida, foram utilizados nos ensaios com os agentes tóxicos.

As variações dos valores dos parâmetros físicos e químicos nesse tanque, durante o período dos testes, foram as seguintes: temperatura da água – $22,0 \pm 1,0$ °C; pH – 6,4 a 7,2; condutividade – 132 a 210 $\mu\text{S}/\text{cm}$; alcalinidade – 39 a 52 mg/L CaCO_3 ; dureza – 40 a 57 mg/L CaCO_3 ; oxigênio dissolvido – 5,9 a 7,5 mg/L; concentração de N-NH_3 – 0,09 a 0,95 mg/L.

Ensaios toxicológicos

O método para o desenvolvimento desses testes está baseado nas 17ª e 18ª ed. do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*³³: a) os testes foram realizados em sistema estático (efluentes da refinaria de petróleo) ou semiestático (metais pesados e amônia), com renovação da solução-teste a cada 24 horas; b) foram utilizados 5 litros de solução-teste em aquários com capacidade máxima de 16 litros; c) a água de diluição utilizada foi água desionizada com dureza e alcalinidade ajustadas entre 40 e 48 mg/L de CaCO_3 ; d) o agente tóxico foi distribuído em seis concentrações selecionadas com base em teste preliminar, delimitadas pela menor concentração na qual não se observou mortalidade de 100% dos organismos e pela concentração mais elevada na qual não se observou mortalidade dos organismos; e) cada série foi constituída pelo conjunto dos seis aquários

com diferentes concentrações, mais o controle (sem o agente tóxico); f) para cada teste foram realizadas duas repetições; g) foram colocados dez organismos em cada aquário, para cada concentração testada, assim como no controle; h) os animais foram distribuídos nos aquários aleatoriamente, sempre em lotes de dois animais por vez. Essa operação foi repetida de forma a manter o mesmo número de organismos em cada aquário da série, até se completarem dez indivíduos por aquário; i) os efluentes foram pré-aerados nos recipientes de coleta em período de 30 a 40 minutos. Durante os testes, os aquários foram aerados com burbilhonamento inferior a 100 bolhas por minuto²⁹; j) todos os aquários foram monitorados nos instantes 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, e 96 horas, considerando os seguintes parâmetros físicos, químicos e biológicos: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e mortalidade dos animais expostos; k) para a avaliação do parâmetro mortalidade dos organismos, foram determinados a $\text{CL}(I)_{50,24h}$, $\text{CL}_{50}(I)_{48h}$, $\text{CL}_{50}(I)_{72h}$, $\text{CL}_{50}(I)_{96h}$, isto é, a concentração nominal do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos em 24, 48, 72, e 96 horas de exposição nas condições de teste. A expressão dos valores nominais com a notação (I) segue a proposta de Lloyd e Tobby³³; l) a água de diluição dos efluentes foi composta de água deionizada com a mesma composição de sais que foi estabelecida nos tanques de aclimação; m) dureza total, alcalinidade e concentração de nitrogênio amoniacal na água foram determinados após completadas 96 horas do início dos testes; n) para a avaliação do parâmetro mortalidade dos organismos, só foi considerado morto aquele que, quando tocado na base do pedúnculo caudal por um bastão de vidro, não apresentou nenhuma reação; o) a sensibilidade da espécie a dicromato de potássio ($\text{CL}_{50,24h}$) situou-se entre 202 e 210 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{L}$; p) foram considerados os testes em que a mortalidade no controle não foi superior a 10% dos organismos testados; q) a maior variação de comprimento entre os animais testados situou-se em 50%.

Determinação da toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda, determinou-se a CL(I)50 para *Hyphessobrycon callistus*, empregando-se o método de Sperman-Karber (Hamilton, 1977). Para cálculo da CE(I)50 e da CL(I)50, utilizou-se o programa computacional "LC50 Programs JS Pear test"³⁰.

Determinação do consumo de oxigênio e excreção de amônia

Para o experimento, foram usados 60 peixes (*Hyphessobrycon callistus*) com massa aproximadamente entre 9,3 g e 7,5 g. Os exemplares de *H. callistus* foram aclimatados durante 5 dias com aeração constante, higienização e renovação diária da água antes de serem utilizados. Os animais foram alimentados com ração colocada nos tanques, sendo a alimentação suspensa 24 horas antes dos experimentos. Para a medição do metabolismo de rotina, foram usadas três réplicas com temperatura variando entre 21 e 22 °C. Quatro diferentes concentrações foram testadas, além de um controle (0,1, 0,5, 1,5 e 2,5 mg de Cd/L). A escolha da concentração de Cloreto de Cádmio usada nesse estudo foi baseada nos dados obtidos em determinação prévia de concentração letal a 50% (LC50). Antes de iniciar o experimento, os animais foram mantidos individualmente em câmaras respirométricas tubulares de acrílico com circulação contínua da água durante 60 minutos, a fim de minimizar o stress provocado pelo manuseio. No final do período de aclimação, introduziu-se separadamente Cloreto de Cádmio (CdCl_2) numa quantidade determinada nos respirômetros por meio de uma pipeta de precisão de maneira a se obter a concentração final desejada. A diferença entre as concentrações determinadas no início e no final do confinamento (após 60 min) foi utilizada para calcular o consumo de oxigênio (mL/g/h) e a excreção de amônia ($\mu\text{L}/\text{mL}/\text{h}$), levando em consideração o volume do respirômetro e o peso úmido do animal. O oxigênio dissolvido foi determinado com base no método de Winkler, e o nitrogênio amoniacal, no método phenolhypochlorite. O consumo médio de oxigênio específico e excreção de amônia por peixe foram avaliados pela análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cádmio é um dos metais pesados que apresenta elevada toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos⁵. Ensaio realizado com diversas espécies de peixes revelaram que a CL(I)50,96h para o Cd situou-se sempre entre 2 e 55 mg/L. Mudanças na qualidade da água (salinidade, dureza, pH, alcalinidade, temperatura e fração de compostos orgânicos) e a utilização de diferentes espécies podem provocar diferenças nos resultados dos testes de toxicidade. Para a USEPA²², a dureza é o principal fator que influi na toxicidade do cádmio.

Na toxicologia aquática clássica, um dos trabalhos mais citados é o de Pickering e Henderson³⁴, que expuseram *Pimephales promelas* em águas de dureza bastante diferentes e obtiveram pequena variação de toxicidade. Carrol, et al apud USEPA²² determinaram o efeito de vários componentes da dureza da água sobre *Salvelinus fontinalis* e concluíram que elevadas concentrações de cálcio limitam o efeito da toxicidade aguda. Calamari, et al apud USEPA²² verificaram um aumento muito acentuado da toxicidade de cádmio para *Salmo gairdneri* com a diminuição da dureza da água. Por esse motivo, para comparações de toxicidade, a dureza da água tem que ser levada em consideração.

O efeito da dureza da água sobre a toxicidade dos sais de cádmio é amplamente conhecido. Segundo Alabaster e Lloyd²¹, o cádmio complexado com carbonatos de cálcio e magnésio torna-se muito menos disponível para absorção, sendo esse um fator que condicionaria a baixa toxicidade desse metal em águas duras.

As CL(I)50 de cádmio para *Hyphessobrycon callistus* constam na Tabela 1. As CL(I)50,24h obtidas na primeira e na terceira réplicas foram, respectivamente, de 6,59 e 6,07 mg de Cd/L. As CL(I)50,48h obtidas foram de 4,79, 4,56 e 3,86 mg de Cd/L. As CL(I)50,72h foram, respectivamente, de 4,31, 4,00 e 3,45 mg de Cd/L. As CL(I)50,96h foram de 3,04, 3,35 e 3,17 mg de Cd/L.

Tabela 1. Valores da toxicidade aguda de cádmio em diferentes períodos de exposição. Os valores de pH situaram-se entre 6,90 e 7,12 na réplica 1, entre 6,92 e 7,22 na réplica 2 e entre 6,95 e 7,18 na réplica 3

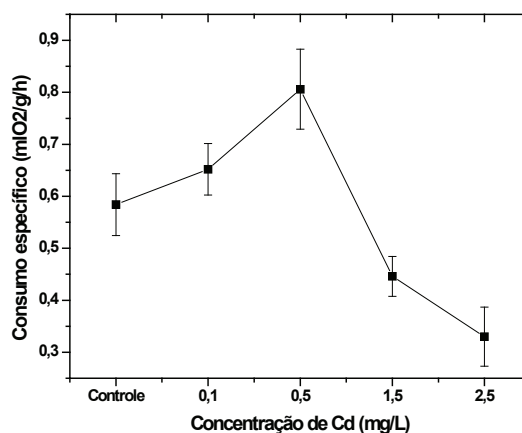
| | CL(l)50 | Intervalo de confiança | | CL(l)50 | Intervalo de confiança | |
|-----------|--|------------------------|-----------------|------------|------------------------|-----------------|
| | mg de CdCl ₂ H ₂ O /L | Limite inferior | Limite superior | mg de Cd/L | Limite inferior | Limite superior |
| Réplica 1 | | | | | | |
| 24h | 11,83 | 10,29 | 13,60 | 6,59 | 5,73 | 7,59 |
| 48h | 8,59 | 7,27 | 10,09 | 4,79 | 4,05 | 5,62 |
| 72h | 7,74 | 6,84 | 8,75 | 4,31 | 3,81 | 4,88 |
| 96h | 5,45 | 4,24 | 7,23 | 3,04 | 2,36 | 4,09 |
| Réplica 2 | | | | | | |
| 24h | 10,55 | 10,35 | 10,75 | 6,30 | 5,80 | 6,80 |
| 48h | 8,19 | 7,04 | 9,52 | 4,56 | 3,92 | 5,30 |
| 72h | 7,12 | 6,12 | 8,28 | 4,00 | 3,41 | 4,61 |
| 96h | 6,02 | 5,16 | 7,01 | 3,35 | 2,88 | 3,91 |
| Réplica 3 | | | | | | |
| 24h | 10,90 | 7,25 | 16,37 | 6,07 | 4,04 | 9,12 |
| 48h | 6,92 | 5,98 | 8,00 | 3,86 | 3,33 | 4,46 |
| 72h | 6,19 | 5,36 | 7,10 | 3,45 | 2,99 | 3,96 |
| 96h | 5,69 | 5,07 | 6,48 | 3,17 | 2,83 | 3,61 |

H. callistus apresentou CL(l)50,96h (em águas com dureza entre 30 e 60 mg/L de CaCO₃/L) muito maior que a de diversas espécies, como é o caso de *Fundulus diaphanus* (0,11 mg/L), *Cyprinus carpio* (0,24 mg/L), *Roccus sexatilis* (1,1 mg/L), *Pimephales promelas* (1,23 a 1,83 mg/L), *Salmo trutta* (1,4 mg/L), *Lepomis gibbosus* (1,5 mg/L), *Salmo gairdneri* (2,3 mg/L) e *Jordanella floridae* (2,5 mg/L)²².

Entre as espécies que apresentaram sensibilidade semelhante a *H. callistus* está *Pimephales promelas* 3,39 mg/L²⁴. Entre as que apresentaram menor sensibilidade, isto é, maior CL50,96h estão *Salvelinus fontinalis* (5,08 mg/L), *Ictalurus punctatus* (7,94 mg/L), *Lepomis macrochirus* (8,81 mg/L) e *Marone americana* (8,4 mg/L)^{35,36}.

O consumo específico de oxigênio para os peixes expostos ao Cd aumentou com o incremento da concentração para as concentrações de 0,1 e 0,5 mgCd/L (0,65 e 0,80 mL de oxigênio/g/h), quando comparados ao controle. Entretanto, a média do consumo específico de oxigênio dos peixes submetidos a 1,5 e 2,5 mg Cd/L diminuiu para 0,44 e 0,33 mL O₂/g/h (Figura 1). Constatou-se, por meio

da ANOVA ($p < 0,05$), (Levene's Test $f = 1,17564$; $P=0,35142$), que as médias foram significativamente diferentes para as concentrações 0,5, 1,5 e 2,5 mgCd/L, em relação ao controle.

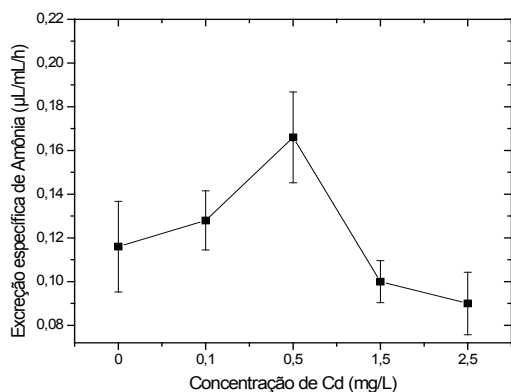
Figura 1. Consumo específico de oxigênio em relação ao aumento da concentração de cádmio

A diminuição no consumo de oxigênio registrada neste trabalho pode estar relacionada a danos citológicos. Isso porque as brânquias são, provavelmente, o primeiro alvo quando se trata

de contaminação por metais, o que inclui espessamento das lamelas branquiais e mudanças profundas nos padrões celulares nas brânquias, com um aumento concomitante na vacuolização hemolinfa e espaços reduzidos, provocando a estagnação e perfusão¹¹. Segundo Boyd³⁵, metais pesados como o Cd têm como efeito principal precipitar e tornar compacta a mucosa que cobre as brânquias, impedindo, dessa maneira, o intercâmbio gasoso. O que certamente deve ter acontecido nesse experimento, uma vez que, com o aumento da concentração de Cd, houve uma diminuição do consumo de oxigênio.

A relação entre intensidade do efeito, concentração e o tempo de exposição depende do estágio de vida e das condições de saúde do organismo em risco. É sabido que, em virtude das larvas serem particularmente sensíveis, deve-se evitar sua exposição a substâncias potencialmente tóxicas, já que o efeito da contaminação por metais pode muito bem representar consequências letais para as fases de desenvolvimento da biota aquática.

Figura 2. Excreção específica de amônia em relação ao aumento da concentração de cádmio



A excreção de amônia dos peixes aclimatados à temperatura de 20 °C variou em função do aumento da concentração do Cd. Houve um aumento da excreção quando expostos à concen-

tração de 0,5 mg/L de Cd (Figura 2). Na maior concentração de Cd (2,5 mg/L) empregada, a média da excreção atingiu 0,90 µL/mL/h, representando uma diminuição da excreção de amônia da ordem de 77,5% em comparação com o valor médio dos animais do grupo controle. Utilizando o teste estatístico Tukey ($p < 0,05$), constatou-se que as médias da excreção de amônia nas duas maiores concentrações empregadas é significativamente diferente em relação ao respectivo controle.

A amônia é um dos produtos finais do catabolismo, principalmente dos aminoácidos. Esses, além de serem utilizados nos componentes da carcaça e estruturas do corpo, podem ainda ser mais importantes do que íons na manutenção da pressão osmótica nos camarões^{5,6,7}. O aumento na excreção de amônia reflete no aumento do catabolismo dos aminoácidos (Figura 2), mesmo quando os peixes foram expostos às mais altas concentrações de Cd. A diminuição da excreção de amônia pode estar relacionada também a danos causados às brânquias, pois a brânquia é um importante órgão excretor em peixes.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o *H. callistus* é um organismo sensível ao Cd, mesmo em baixas concentrações. Essa espécie nativa respondeu aos ensaios de toxicidade aguda, bem como aos testes metabólicos de consumo de oxigênio e excreção de amônia. Assim sendo, o *H. callistus* pode ser utilizado em protocolos de toxicidade para organismos aquáticos.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Processo n. 308700/2010-4).

REFERÊNCIAS

1. Elinder CG. Iron. In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB. Handbook on the toxicology of metals. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier / New York: Oxford; 1986.
2. Mance G. Pollution threats of heavy metals in aquatic environments. London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.; 1987. p. 230.
3. Evans DH. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. Environ Health Perspect. 1987;71:47-58.
4. Adeyem OK. Haematological Profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to Lead. Turk J Fisheries Aquatic Sci. 2007;7:163-9.
5. Barbieri E, Passos EA, Aragão KAS, Santos DB, Garcia CAB. Assessment of Trace Metal Levels in Catfish (*Cathorops spixii*) from Sal River Estuary, Aracaju, State of Sergipe, northeastern Brazil. Water Environ Res. 2010;82(12):2301-5.
6. Barbieri E. Acute toxicity of ammonia in White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquaculture. 2010;302:231-7.
7. Barbieri E. Acute toxicity of ammonia on juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. Aquaculture Int. 2012;20(2):373-82.
8. Eysink GGJ, Pádua HB, Bertolotti SAE, Pereira DN. Metais pesados no vale do Ribeira e em Iguape – Ilha Comprida. R Ambiente. 1988;2(1):6-13.
9. Eysink GGJ, Pádua HB, Martins MC. Presença de Mercúrio no Ambiente. R Ambiente. 1988;2(1):43-50.
10. Barbieri E. Use of Oxygen Consumption and Ammonium Excretion to Evaluate the Sublethal Toxicity of Cadmium and Zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). Water Environ Res. 2007;79(6):641-8.
11. Barbieri E, Doi SA. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). Marine Freshwater Behaviour Physiol. 2011;44(4):251-63.
12. Carvalho CEV, Cavalcante MPO, Gomes MP, Faria VV, Rezende CE. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões (Perna perna, L.) da Ilha de Santana, Macaé, RJ, Brasil. Ecotoxicol Environ Rest. 2001;4(1):1-5.
13. Carvalho CEV, Faria VV, Cavalcante PO, Gomes MP, Rezende CE. Distribuição de Metais Pesados em Peixes Costeiros Bentônicos da Região de Macaé, RJ, Brasil. Ecotoxicol Environ Rest. 2000;3(2):12-6.
14. Barbieri E. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, PérezFarfante, 1967, Crustacea). Ecotoxicology. 2009;18(2):312-8.
15. Barbieri E, Phan VN, Gomes V. Efeito do DSS, dodecil sulfato de sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. Rev Bras Biol. 1998;58(2):263-71.
16. Papathanassion E. Effects of Cadmium and mercury ions on respiration and survival of the common prawn *Palaemon serratus*. (Pennant). Rev Inst Oceanogr Med. 1983;70:21-35.
17. Wu JP, Chen HC. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere. 2004;57(11):1591-8.
18. Barbieri E, Serralheiro PC, Rocha IO. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (mullet) according to the temperature and salinity. J Exp Mar Biol Ecol. 2002;277:109-27.
19. Barbieri E, Paes ET. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. Chemosphere. 2011;84:9-16.
20. Eisler R, Hennekey RJ. Acute toxicities of Cd, Cr, Hg, Ni and Zn to estuarine macrofauna. Arch Environ Contam Toxicol. 1987;6:315-23.
21. Alabaster JS, Lloyd R. Water quality criteria for freshwater fish. London: Butterworks; 1980. 297 p.
22. USEPA. Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receivingwaters to freshwater organisms. 2nd ed. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency; 1989. USEPA 600/4- 89/001. 250 p. 1989.
23. WHO. Environmental Health Criteria 134: Cadmium. Geneva: World Health Organization; 1992. 280 p.
24. USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 1991. USEPA 600/4-90/027. 293 p. 1991.
25. Sorensen EMB. Copper. In: Sorensen EMB, editor. Metal Poisoning in Fish. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 235-84.
26. Dimitrova MS, Tishinova T, Velcheva V. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp. Comp Biochem Physiol C. 1994;108C:43-6.
27. Vosylienė MZ. The effect of heavy metal mixture on haematological parameters of rainbow trout. In: Lovejoy DA, editor. Heavy metals in environment. An integrated approach. Vilnius: Institute of Geology. Metalecology Society; 1999. p. 295-8.
28. Rogers JT, Richards JG, Wood CM. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout. Aquatic Toxicol. 2003;64(2):215-34.

29. Peltier WH, Weber C. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms. EPA/600/4-85/013. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, O. H. p. 216, 1985.
30. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environ Sci Technol. 1977;11(7):714-9.
31. Barbieri E, Passos EA, Garcia CAB. Use of metabolism to evaluate the sublethal toxicity of mercury on *Farfantepaneus brasiliensis* larvae (Latreille 1817, crustacean). J Shellfish Res. 2005;24(4):1229-34.
32. Damato M, Barbieri E. Determinação da toxicidade aguda do cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*). Mundo Saúde. 2011;35(4):401-7.
33. APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: APHA; 1989. p. 2-74.
34. Pickering QH, Henderson NC. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. Air Water Pollut. 1966/10(6):453-63.
35. Boyd C. Water quality in ponds for aquaculture. Auburn University, Alabama. Birmingham Publishing Co. Alabama. 482p. 1990.
36. USEPA. Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3rd ed. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency; 1994. USEPA 600/4-91/002. 133 p. 1994.